

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE



MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

SOMMAIRE DU N° 4

Page

- De l'action combinée de l'antigène méthylique et de la streptomycine sur la tuberculose du cobaye et du lapin, par L. NÈGRE
- Variante eugonique du type murin du bacille tuberculeux (études bactériologiques et expérimentales), par E. GRASSET
- Détermination des types de staphylocoques par l'agglutination, par P. MERCIER, J. PILLET et M^{me} P. CHABANIER
- Nouvelles recherches sur les hémolysines oxydables, par MAYLIS GUILLAUMIE et A. KRÉGUER.
- Recherches épidémiologiques sur l'épidémie d'encéphalite survenue dans le Palatinat de 1947 à 1949, par R.-E. BADER et R. HENGEL
- Sur la destruction du 2-3 butanediol et de l'acétoïne par les microbes. — I. Cas du *Bacillus subtilis*, par M. HOOREMAN, J.-P. AUBERT, M. LEMOIGNE et J. MILLET
- Sur la destruction du 2-3 butanediol et de l'acétoïne par les microbes. — II. Utilisation du 2-3 butanediol par *B. megatherium*, par M. HOOREMAN, J.-P. AUBERT et P. DUPUY.
- Accumulation des substances dissoutes par les corps microbiens. Étude quantitative par polarographie. — I. Fixation du bleu de méthylène, par A. KEPES
- Action du bactériophage sur la toxicité des cultures jeunes du *Cl. perfringens* type A, par A. GUELIN et A. KRÉGUER
- Société française de microbiologie (Sommaire page 4 de la couverture)

Œuvres de Pasteur réunies par PASTEUR VALLERY-RADOT, tome VII « Mélanges scientifiques et littéraires. Index analytique de l'œuvre de Pasteur ». Un vol. in-8° de 666 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.

Albert Calmette. Sa vie. Son œuvre scientifique, par P. NOËL BERNARD LÉOPOLD NÈGRE. *Préface de Pasteur Vallery-Radot. Avant-propos de A. Yersin.* Un vol. de 274 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.

J. BORDET. — Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. Deuxième édition. Un volume de 880 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.

ANDRÉ-R. PRÉVOT. — Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies. Un volume in-8° de 290 pages, 2^e édition (*Monographie de l'Institut Pasteur*), Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1948.

MARGUERITE LWOFF. — Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomides. Un vol. de 244 pages (*Monographie de l'Institut Pasteur*). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1941.

EDM. SERGENT, A. DONATIEN, L. PARROT et F. LESTOQUARD (in memoriam). — Etude sur les piroplasmoses bovines. Un vol. in-16 de 816 pages, 325 illustrations, 1945 (*Institut Pasteur, Alger*).

N. B. — Le paiement est accepté en toutes monnaies étrangères au cours du dollar au moment du règlement.

PRIX DE L'ABONNEMENT POUR 1950

France et Union Française	Fr. 2.000
(Règlement par mandat, chèques postaux [Compte n° 599 Paris] ou chèque bancaire.)	
Belgique et Luxembourg	Fr. B. 375
Autres pays	\$ U. S. A. 7,

Prix également payables dans les autres monnaies au cours des règlements commerciaux le jour du paiement.
(Règlement par Banque Nationale.)

Changement d'adresse : 20 fr.

Secrétariat, 25, rue du Docteur-Roux, Paris (XV°).

Publication mensuelle.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

DE L'ACTION COMBINÉE DE L'ANTIGÈNE MÉTHYLIQUE ET DE LA STREPTOMYCINE SUR LA TUBERCULOSE DU COBAYE ET DU LAPIN

par L. NÈGRE (*).

(*Institut Pasteur.*)

Nous avons, avec A. Boquet [1] il y aura bientôt trente ans, préparé l'antigène méthylique dans le laboratoire de A. Calmette et montré que ce produit donne, dans la mise en évidence des anticorps tuberculeux, des résultats équivalents à ceux de l'antigène peptoné de Calmette et Massol et de l'antigène à l'œuf de Besredka.

Depuis lors, l'antigène méthylique est couramment employé pour la recherche des anticorps tuberculeux par la déviation du complément. Précisant la nature de la fraction haptène qu'il contient, M. A. Machebœuf, M^{me} G. Lévy et M^{lle} Faure [2] ont constaté qu'elle est constituée par un mélange d'acides complexes très voisins qu'on peut appeler acides phosphatidiques.

A la suite de nos recherches sur le rôle de l'antigène méthylique dans la réaction de fixation du complément, nous avons essayé, avec A. Boquet, de mettre en évidence les effets de ce produit sur l'animal sain et l'animal tuberculeux.

Des injections fractionnées d'une dose totale de 20 centicubes d'antigène méthylique (solution mère correspondant à 1 cg. de

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1^{er} décembre 1949.

bacilles de Koch secs par centicube) provoquent, chez des cobayes et des lapins neufs, la formation d'anticorps tuberculeux. Lorsque les animaux, ainsi préparés, sont éprouvés par l'inoculation d'un bacille virulent, ils présentent des lésions beaucoup moins importantes que celles des témoins non préparés.

D'autre part, des cobayes et surtout des lapins tuberculeux traités par des doses convenables d'antigène méthylique présentent une augmentation de leurs anticorps, un ralentissement dans l'évolution de leurs lésions et un maintien en bon état général qui peut être expliqué, comme nous l'avons vu avec A. Boquet, par la propriété que possède l'antigène méthylique de neutraliser les toxines sécrétées par le bacille de Koch.

L'antigène méthylique a donc un certain pouvoir immunisant et un pouvoir antitoxique.

Depuis vingt-cinq ans il est utilisé dans la pratique courante pour le traitement des tuberculoses externes, chirurgicales et pleurales [3]. Il est moins employé dans les formes pulmonaires parce qu'il contient une très minime fraction de tuberculine, cette substance étant solubilisée par l'alcool méthylique absolu. Aux doses qu'on a l'habitude d'injecter aux sujets traités, les cliniciens appréhendent les réactions focales qu'il pourrait provoquer chez les porteurs de lésions des poumons. Certains auteurs, comme P. Bourgeois et M^{me} P. Boquet [4], ont traité des malades atteints de formes graves de cette localisation par des doses d'antigène méthylique très inférieures à celles couramment utilisées. Ils ont constaté qu'elles étaient bien supportées et avaient parfois des effets favorables.

Pensant à l'action stabilisante exercée par la streptomycine, nous nous sommes demandé si, comme on l'a fait pour la tuberculine et les sulfones [5], on ne pourrait pas, en associant cet antibiotique à l'antigène méthylique, injecter ce dernier avec plus de sécurité aux sujets hypersensibles et les faire bénéficier des actions conjuguées de ces deux produits.

Il fallait d'abord s'en rendre compte chez les animaux de laboratoire. C'est dans ce but que nous avons entrepris les recherches relatées dans ce mémoire.

Pour étudier les effets d'un médicament associé à la streptomycine, A. G. Karlson et W. H. Feldman [6] ont montré que chez des cobayes tuberculeux de 500 g. environ, la dose de cet antibiotique qui doit leur être injectée en action d'appoint est de 2 mg. par jour. A cette dose, qui représente le quart de celle qui devrait être utilisée chez des animaux de ce poids, la streptomycine donne des résultats incomplets, ce qui permet de mettre en évidence l'action du médicament qui lui est associé s'il en a une.

Nous avons donc adopté la dose quotidienne de 2 mg. de strep-

tomycine (1) chez des cobayes de 400 g. à 500 g. Les lapins pesant un peu plus de 2 kg. ont été traités par une quantité de cet antibiotique cinq fois plus élevée : 10 mg.

En ce qui concerne l'antigène méthylique, nous avons volontairement employé des doses fortes de ce produit, proportionnellement aux poids des animaux traités pour voir si, sous la protection d'une quantité, même faible, de streptomycine, elles seraient bien tolérées et efficaces.

Avant d'étudier l'action combinée de l'antigène méthylique et de la streptomycine sur des cobayes et des lapins tuberculeux, nous avons voulu mettre en évidence l'influence exercée par des injections préventives d'antigène méthylique sur la tuberculose du cobaye, et nous rendre compte de l'action adjuvante de la streptomycine sur des lapins tuberculeux préparés, avant leur infection, par des injections répétées d'antigène méthylique.

1° ACTION PRÉVENTIVE DE L'ANTIGÈNE MÉTHYLIQUE SUR LA TUBERCULOSE DU COBAYE.

EXPÉRIENCE I. — 8 cobayes ont reçu deux fois par semaine des injections sous-cutanées de 2 + 2, 3 + 3, 4 + 4 cm³ de la solution mère d'antigène méthylique dont 1 cm³ correspond à 1 cg. de bacilles tuberculeux secs. La dose totale d'antigène méthylique injectée a été de 18 cm³.

Dix jours après la dernière injection, ils ont été éprouvés, ainsi que 4 cobayes témoins, par inoculation sous-cutanée de 0,002 mg. de la souche bovine Dupray S. Ils ont tous été sacrifiés deux mois et demi après la date de leur infection.

Les lésions ganglionnaires des cobayes préparés par l'antigène méthylique n'ont pas présenté de différences sensibles avec celles des cobayes témoins.

Ces derniers ont eu d'assez nombreux tubercules sur la rate, leurs autres organes ont été exceptionnellement atteints. Par contre, chez les cobayes préalablement préparés par l'antigène méthylique, 3 n'ont eu aucune lésion sur la rate ; 2 : un petit tubercule, 2 : deux petits tubercules et 1 : onze tubercules. Les poumons et le foie ont paru indemnes de lésions.

D'après le calcul du nombre moyen des tubercules sur la rate dans chacun de ces deux groupes, les cobayes préparés préventivement par l'antigène méthylique ont présenté sept fois moins de lésions que les cobayes témoins.

(1) Nous tenons à exprimer nos bien vifs remerciements à MM. les Professeurs J. Tréfouël, directeur de l'Institut Pasteur, et Aronson, de Philadelphie, pour la streptomycine qu'ils ont bien voulu mettre à notre disposition.

Ces résultats montrent l'action protectrice exercée sur une infection tuberculeuse ultérieure par des injections préventives de doses massives d'antigène méthylique.

2° ACTION PRÉVENTIVE DE L'ANTIGÈNE MÉTHYLIQUE
SUR LA TUBERCULOSE DU LAPIN,
ACTION CURATIVE SURAJOUTÉE DE LA STREPTOMYCINE.

EXPÉRIENCE II. — 8 lapins de 2 kg. environ sont préparés par des injections intraveineuses bihebdomadaires de 2 + 2, 3 + 3, 4 + 4 cm³ de la solution mère d'antigène méthylique dont 1 cm³



FIG. 1. — Poumons de lapins tuberculeux. I, témoins; II, traités par l'antigène méthylique avant leur infection et par la streptomycine après leur infection; III, traités par l'antigène méthylique avant leur infection.

correspond à 1 cg. de bacilles tuberculeux secs. Ils ont donc reçu, au total, 18 cm³ d'antigène méthylique.

Dix jours après la dernière injection, ils ont été éprouvés, ainsi que 4 lapins témoins, par une inoculation intraveineuse de 0,005 mg. de la souche bovine Dupray S.

Un mois après la date de leur infection, 3 lapins parmi ceux qui ont été préparés par l'antigène méthylique ont reçu chaque jour, sauf le dimanche, par la voie sous-cutanée, 10 mg. de strep-

tomycine représentant à peu près le quart de la dose de cet antibiotique par laquelle ils auraient dû être traités en raison de leur poids.

Le traitement de ces 3 lapins par la streptomycine a duré quarante-neuf jours. Tous ces animaux ont été sacrifiés deux mois et demi après leur infection.

Alors que les témoins (fig. 1, I) ont présenté des tubercules confluents sur leurs poumons et nombreux sur tous leurs autres organes, les lapins qui ont été préparés par l'antigène méthylique (fig. 1, III) avant leur infection n'ont eu que quelques rares grosses lésions de résistance sur leurs poumons. Les autres organes de ces animaux sont restés, chez la plupart d'entre eux, presque complètement indemnes de lésions.

Il en a été de même chez ceux qui ont reçu, en plus des injections préventives d'antigène méthylique, un traitement par la streptomycine (fig. 1, II). Ils ont présenté, sur leurs poumons, des lésions ayant les mêmes caractères que celles des lapins du groupe précédent, mais encore plus clairsemées. On peut voir sur les poumons du deuxième lapin (traité préventivement par l'antigène méthylique puis par la streptomycine) une grosse lésion en chou-fleur, que nous avons déjà signalée avec A. Boquet chez des lapins préparés par l'antigène méthylique, puis infectés.

Le traitement par la streptomycine a donc complété l'action préventive de l'antigène méthylique, déjà très importante par elle-même.

Ces résultats concordent avec ceux de Steenken et Wolinski [7] ainsi que ceux d'Etienne Bernard et B. Kreis [8] qui ont mis en évidence l'action adjuvante de la streptomycine chez des cobayes préalablement vaccinés par le BCG, puis traités par cet antibiotique après leur infection par un bacille virulent.

3° ACTIONS COMBINÉES DE L'ANTIGÈNE MÉTHYLIQUE

ET DE LA STREPTOMYCINE

SUR LA TUBERCULOSE DU COBAYE ET DU LAPIN.

EXPÉRIENCE III. — 40 cobayes ont été infectés par la voie sous-cutanée avec 0,01 mg. de la souche de bacilles tuberculeux humains 572 et divisés en quatre groupes de 10 animaux chacun : 1° traités par l'antigène méthylique seul : 1/4 de centimètre cube d'antigène pur par la voie sous-cutanée, deux fois par semaine ; 2° traités par la streptomycine en injections sous-cutanées : dose quotidienne, 2 mg. en deux fractions égales matin et soir, sauf le dimanche ; 3° traités par les deux produits combinés, aux mêmes doses et de la même façon ; 4° témoins.

Les traitements ont commencé huit jours après la date d'infec-

tion des animaux. Ceux-ci ont été sacrifiés deux mois après l'inoculation virulente. Les tubercules ont été dénombrés pour établir leur moyenne dans chaque groupe, soit par organe, soit par animal. Lorsque les tubercules dépassaient le nombre de 30, ils ont été cotés par les chiffres suivants :

Tubercules nombreux.	40
Tubercules très nombreux	50
Tubercules confluents.	60

Dans les trois groupes des cobayes traités, les lésions ganglionnaires ont été à peu près semblables à celles des témoins. Ces derniers ont présenté de nombreux tubercules sur tous leurs organes : rate, foie et poumons.

Chez les cobayes traités par la streptomycine seule, trois d'entre eux ont eu sur la rate moins de 5 tubercules, les trois autres de 40 à 50 tubercules. Les lésions sur les organes autres que la rate ont été exceptionnelles et très rares, sauf chez l'un d'eux.

Dans le groupe des 10 traités par l'antigène méthylique seul, le nombre des lésions a été à peu près semblable à celui des témoins. Nous avons, en effet, constaté avec A. Boquet que chez les cobayes tuberculeux, on ne peut mettre en évidence l'action de l'antigène méthylique que dans le cas d'une infection évoluant lentement, comme celle qui est créée chez ces animaux par instillation de bacilles virulents sur la conjonctive oculaire.

Dans ces expériences avec la streptomycine, nous avons employé, comme voie d'infection du cobaye, la voie sous-cutanée pour nous placer dans les mêmes conditions que les auteurs américains dans leurs recherches sur cet antibiotique. Il n'y a donc rien d'étonnant à ce que nous ayons eu des résultats négatifs avec l'antigène méthylique.

Malgré ces conditions défavorables, les cobayes traités par l'antigène méthylique et la streptomycine associés n'ont présenté

TABLEAU I.

TRAITÉS PAR	NOMBRE DE COBAYES à la fin de l'expérience	NOMBRE MOYEN de tubercules apparents sur les rates	NOMBRE MOYEN de tubercules apparents par animal	PROPORTION p. 100 par rapport aux témoins
Streptomycine	6	21,4	35,7	62
Antigène méthylique	10	30,3	60,4	
Antigène méthylique + Streptomycine.	8	8,6	11,3	19
Témoins	6	29,1	57,5	100

que quelques rares tubercules sur la rate, un seul en avait de plus nombreux. Les autres organes ont été exceptionnellement atteints de quelques rares lésions.

Le dénombrement des tubercules apparents sur les organes des cobayes des quatre groupes, a donné les résultats indiqués dans le tableau I.

Bien que dans cette expérience l'antigène méthylique n'ait pas manifesté d'action propre pour les raisons que nous avons indi-



FIG. 2. — Poumons de lapins tuberculeux. I. traités par la streptomycine seule; II, traités par l'antigène méthylique seul; III, traités par la streptomycine et l'antigène méthylique associés; IV, témoins.

quées, le groupe des cobayes traités par ce produit associé à la streptomycine a eu trois fois moins de lésions que celui des cobayes soumis à un traitement par la streptomycine seule. Son action propre s'est donc ajoutée à celle de cet antibiotique.

EXPÉRIENCE IV. — 16 lapins ont été infectés par la voie veineuse avec 0,005 mg. de la souche bovine Dupray S et divisés en quatre groupes de 4 animaux chacun : 1° traités par l'antigène méthylique : injections sous-cutanées bihebdomadaires de 0,5 cm³ d'antigène méthylique pur ; 2° traités par la streptomycine : injections sous-cutanées de 10 mg. en deux fractions égales, matin et soir chaque jour, sauf le dimanche ; 3° traités par ces deux pro-

duits avec les mêmes doses et de la même façon ; 4° témoins.

Les traitements ont commencé huit jours après l'infection de ces animaux. Ils ont tous été sacrifiés deux mois après la date de leur infection.

Les deux témoins survivants ont présenté de très nombreux tubercules sur les poumons et d'assez nombreux tubercules sur la rate, le foie et les reins.

Les trois groupes de lapins traités ont eu sur leurs poumons et leurs autres organes des lésions beaucoup moins nombreuses que les témoins. Mais la réduction la plus prononcée du nombre des tubercules a été observée chez les lapins traités par l'antigène méthylique et la streptomycine associés (voir fig. 2).

TABLEAU II.

TRAITES PAR	SURVIVANTS	NOMBRE MOYEN de tubercules apparents par organe				NOMBRE MOYEN de tubercules apparents par animal	PROPORTION p. 100 par rapport aux témoins
		Poumons	Rate	Foie	Reins		
Streptomycine	4	26	3,5	0	0	29,5	43
Antigène méthylique	3	33	3	0	3	39,3	57
Streptomycine + Antigène méthylique.	4	10,2	0,5	0	0	10,7	15
Témoins	2	50	12	2,5	3,5	68	100

L'antigène méthylique et la streptomycine associés ont donc été environ quatre fois plus efficaces que l'antigène seul et trois fois plus que la streptomycine seule.

CONCLUSIONS.

Des injections préventives répétées d'antigène méthylique, (au total 18 cm³ de la solution mère de ce produit, correspondant à 1 cg. de bacilles secs par centimètre cube) sont capables de conférer une résistance antituberculeuse très importante à des cobayes et à des lapins infectés avec un bacille virulent, dix à quinze jours après la dernière injection d'antigène méthylique.

Cette résistance est légèrement accrue par un traitement avec une faible dose de streptomycine commencée un mois après l'infection de ces animaux.

Des cobayes et des lapins infectés avec un bacille virulent et traités dès le début de la deuxième semaine suivant leur infection

par des injections bihebdomadaires d'antigène méthylique et quotidiennes de streptomycine (dose réduite), présentent moins de lésions que ceux qui ont été traités par chacun de ces produits utilisé seul, aux mêmes doses et de la même façon.

Chez tous les animaux tuberculeux traités, l'antigène méthylique et la streptomycine associés ont été trois fois plus efficaces que cet antibiotique injecté seul, aussi bien lorsque l'antigène méthylique n'a pas manifesté d'action propre (cobayes) que lorsqu'il a agi par lui-même (lapins).

Il ressort donc de nos expériences que, sous le couvert de la streptomycine, l'antigène méthylique injecté à doses fortes, proportionnellement aux poids des animaux traités, a été non seulement bien toléré mais efficace.

Ces résultats permettent d'espérer que, grâce à l'action stabilisante de la streptomycine, l'antigène méthylique pourra probablement être employé dans le traitement des sujets tuberculeux les plus sensibles qui pourront ainsi bénéficier de son action se superposant à celle de cet antibiotique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOQUET (A.) et NÈGRE (L.). *Ces Annales*, 1921, **35**, 300 ; 1923, **37**, 787 ; 1925, **39**, 101 ; 1930, **95**, 415. *C. R. Acad. Sci.*, 1924, **178**, 891. *Rev. Tub.*, 1924, **5**, 388.
- [2] MACHEBOEUF (M. A.), LÉVY (G.) et FAURE (M.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1935, **17**, 1218. *C. R. Acad. Sci.*, 1935, **200**, 1547 ; 1937, **204**, 1843.
- [3] NÈGRE (L.) et BOQUET (A.). *Antigénotherapie de la tuberculose par les extraits méthyliques de bacilles de Koch*, 1 vol., 158 pages, Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1927. *Traitement de la tuberculose par l'antigène méthylique*, 1 vol., 265 pages, Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1932.
- [4] BOURGEOIS (P.) et BOQUET (M^{me} P.). *Sem. Hôp. Paris*, 25 septembre 1941, 619.
- [5] RIST (Noël) et COTTET (Jean). Les sulfones en thérapeutique. *La Presse Médicale*, 13 août 1949, 743.
- [6] KARLSON (A. G.) et FELDMAN (W. H.). *Am. Rev. Tub.*, 1948, **58**, 129.
- [7] STEENKEN et WOLINSKI. *Am. Rev. Tub.*, 1947, **56**, 227.
- [8] BERNARD (Et.) et KREIS (B.). I^{er} Congrès Internat. du BCG, Institut Pasteur, Paris, 1948.

VARIANTE EUGONIQUE DU TYPE MURIN
DU BACILLE TUBERCULEUX
(ÉTUDES BACTÉRIOLOGIQUES
ET EXPÉRIMENTALES)

par E. GRASSET.

(*Institut d'Hygiène. Université de Genève.*)

Au cours d'une épizootie observée, en 1937, chez les campagnols (*Microtus agrestis*) de divers comtés du sud de l'Angleterre, A. Wells [1] mettait en évidence, au sein des lésions de caractère nécrotique tuberculeux observées chez les rongeurs examinés, la présence de bacilles acido-résistants.

Il montrait également la nature contagieuse de l'infection, par transmission expérimentale à des campagnols neufs, soit par injection de matériel d'autopsie, soit par ingestion d'aliments contaminés, soit, enfin, par cannibalisme de rongeurs infectés introduits dans des communautés de campagnols neufs.

Wells réussit à isoler de ces lésions et à cultiver sur milieu de Dorset à l'œuf non glycérimé un bacille alcool- et acido-résistant, dont les colonies n'apparaissaient souvent que quatre à huit semaines après l'ensemencement et se développaient lentement au cours des mois suivants.

Les passages effectués sur ce même milieu gardaient un caractère disgonique. L'introduction de glycérine ne paraissait pas favoriser leur développement, tant sur Dorset que sur milieu de Löwenstein et pomme de terre.

Par ailleurs, les essais de culture en surface sur milieu de Sauton et bouillon simple et glycérimé se montraient, sauf en de rares exceptions, infructueux.

L'injection de 0,000.001 mg. de ces cultures sur milieu de Dorset suffisait à reproduire l'infection expérimentale mortelle en deux à six mois chez des campagnols neufs. Par contre, l'administration par voie sous-cutanée de doses massives, telles que 0,1 à 1 mg. de ces bacilles acido-résistants chez le cobaye et le lapin ne produisit que des abcès locaux sans généralisation de l'infection. Les mêmes doses ne parvinrent à tuer les animaux qu'en injections intrapéritonéales ou intraveineuses.

Ces faits furent confirmés par divers auteurs, tels que Griffith [2], Griffith et Dalling [3], Irwin et O'Connell [4], Corper

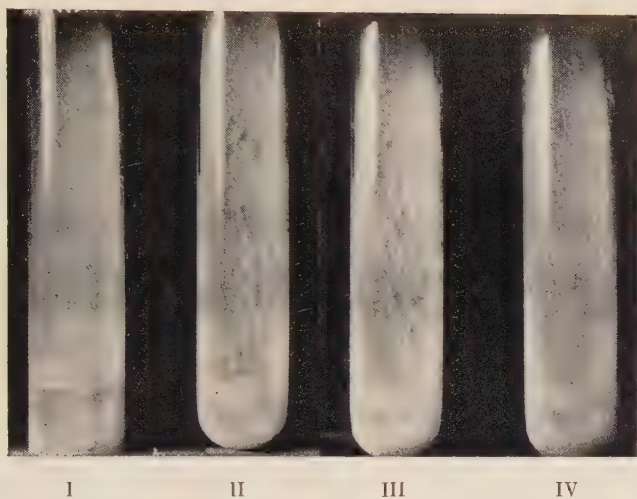


FIG. 1. — Variante eugonique du type murin du bacille tuberculeux.

Cultures de huit jours à 37° C sur milieu de Dorset : n° I, non glycérimé; n° II, glycérimé 2 p. 100; n° III, glycérimé 5 p. 100; n° IV, glycérimé 10 p. 100.

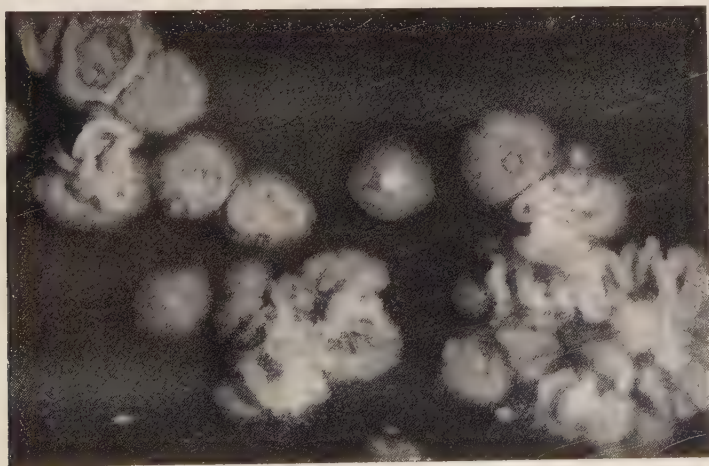


FIG. 2. — Variante eugonique du type murin du bacille tuberculeux.

Colonies de cultures de 8 jours à 37° C sur milieu de Dorset glycérimé à 2 p. 100. (Gross. : $\times 8$.)

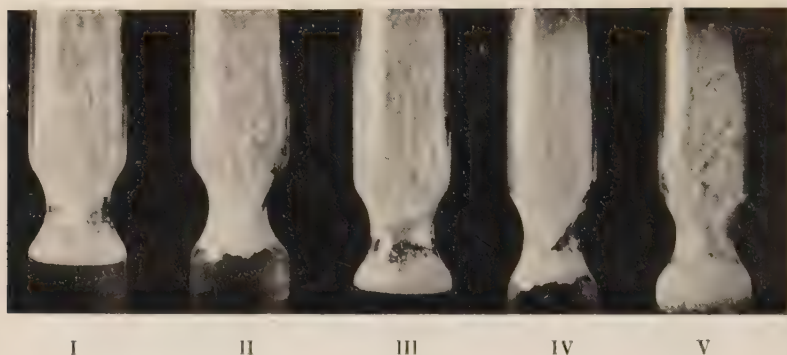


FIG. 3. — Variante eugonique du type murin du bacille tuberculeux.

Cultures de huit jours à 37° C sur milieu à la pomme de terre : n° I, non glycé-
n° II, glycériné 2 p. 100; n° III, glycériné 5 p. 100; n° IV, glycériné 10 p. 100; n° V, pom-
de terre Sauton.

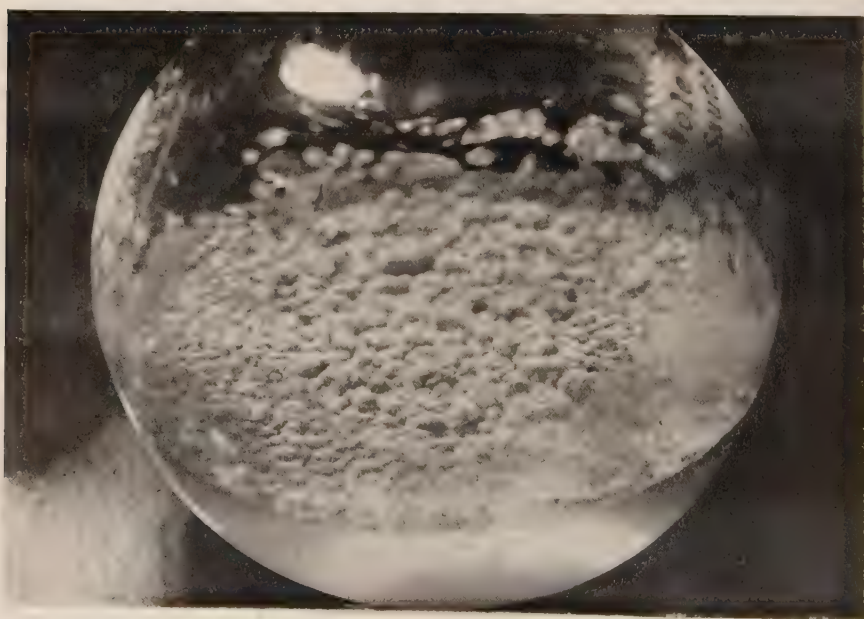


FIG. 4. — Variante eugonique du type murin du bacille tuberculeux.

Culture en voile de trente jours à 37° C sur milieu de Sauton.

et Cohn [5], ainsi que par nous-mêmes (Grasset, Murray et Davis [6]).

De l'ensemble de ces constatations et des phénomènes allergiques tuberculeux observés avec ces bacilles, ainsi que des différences sérologiques avec les bacilles tuberculeux humains, bovins et aviaires, Wells se crut autorisé à conclure à la mise en évidence d'un nouveau type murin de bacille tuberculeux (Wells [7]).

Recherchant la sensibilité de divers rongeurs africains à ce nouveau type *murin* de bacille tuberculeux, nous avons observé que certains d'entre eux, tels que les gerbilles (*Tatera afra* et *T. brantsii*) et la souris multimammaire (*Mastomys coucha*), montraient une réceptivité comparable à celle des campagnols anglais.

Les recherches et enquêtes poursuivies par l'auteur et ses collaborateurs en Afrique du Sud pour déceler une infection, dans des conditions naturelles, des rongeurs africains, de même que celles poursuivies ultérieurement par eux, en Suisse, sont restées, jusqu'ici, infructueuses.

Au cours de recherches entreprises dans le but de stimuler le développement culturel de ce bacille tuberculeux, type murin, nous avons observé que l'introduction d'extraits d'organes de gerbilles dans les milieux de Dorset accélérât sensiblement le développement des cultures sur ce milieu, bien que celui-ci restât considérablement plus lent que celui de caractère eugonique du bacille tuberculeux humain ou même du type dysgonique du bacille tuberculeux bovin.

De même, nos essais, ainsi que ceux d'autres expérimentateurs, dans le but d'obtenir des cultures en voile en surface sur milieu de Sauton ou bouillon additionné ou non de glycérine, n'aboutirent qu'à l'obtention de pellicules fines en surface, limitées et non repiquables en série. Wells ne réussit que dans deux cas à obtenir des cultures en surface, sur milieu de Douglas à l'extrait de pomme de terre et de foie. L'addition de 1 p. 100 d'albumine bovine cristallisée à un milieu synthétique à base d'asparagine et de citrate d'ammoniaque donna une culture floconneuse en profondeur.

Dubos [8], utilisant un milieu contenant des lipoides et 0,1 p. 100 d'albumine sérique purifiée, obtint une multiplication en profondeur plus abondante et plus rapide du bacille tuberculeux, type murin, qui put être mise en évidence dès le huitième jour.

ORIGINE DE LA VARIANTE EUGONIQUE DU TYPE MURIN DU BACILLE TUBERCULEUX.

Au cours d'expériences entreprises depuis 1946 dans le but de rechercher la sensibilité de divers rongeurs sauvages européens, nous avons observé chez la souris forestière (*Apodemus*

sylvaticus) injectée avec une souche de bacilles tuberculeux murins provenant de la National Collection of Type Culture London n° 5676, une infection de caractères semblables à ceux observés chez son proche parent zoologique, le *Microtus agrestis*, en Angleterre.

Procédant à l'isolement secondaire de contrôle de bacilles tuberculeux type murin des lésions des rongeurs ainsi infectés, nous avons constaté que la culture obtenue sur Dorset et Lœwenstein d'un abcès d'une souris des bois ayant succombé six mois et quatre jours après injection sous-cutanée de bacilles tuberculeux murins, montrait des caractères de croissance considérablement plus précoces que d'ordinaire. Trois repiquages sur Dorset non glyciné donnèrent des colonies de 1 à 2 mm., après huit jours d'étuve à 37° C. Par repiquages en série sur ce même milieu effectués dans les jours suivant l'apparition des colonies, nous avons obtenu, après deux mois, une souche dont les colonies apparaissaient dès le quatrième ou cinquième jour d'étuve à 37° C, puis, après trois mois, dès le deuxième ou troisième jour de séjour à 37° C.

L'ensemencement sur des milieux glycinés à 2 et 5 p. 100 a montré que ces colonies se développaient aussi bien sur milieux glycinés que sur ceux non glycinés.

Les premières colonies apparaissent comme un fin semis granité sec, se transformant déjà, après une semaine, en cultures d'aspect verruqueux, blanc ivoire, proéminent au milieu et dont la croissance continue au cours des quatre à cinq semaines suivant l'ensemencement pour donner une culture épaisse verruqueuse, de caractères semblables à ceux des bacilles tuberculeux type humain.

Des examens microscopiques effectués sur les fines colonies quatre à cinq jours après l'ensemencement montrèrent des éléments bacillaires de 2 à 5 μ , généralement rectilignes, plus ou moins granuleux, et partiellement colorés par le Gram, retenant la fuchsine de Ziehl après décoloration par SO_4H_2 à 5 p. 100 et partiellement acido-résistants après traitement par SO_4H_2 à 25 p. 100.

Ces mêmes colorations, répétées après sept jours de culture, montrèrent alors des bacilles acido-résistants, résistant à la coloration par SO_4H_2 à 25 p. 100, ceci tant pour les cultures sur milieu glyciné que sur ceux non glycinés.

Nous avons alors procédé à des ensemencements sur toute une série de milieux, soit :

Pour les milieux *solides* :

Pomme de terre simple et additionnée de 2, 5 et 10 p. 100 de glycérine ;

Dorset simple et additionné de 2, 5 et 10 p. 100 de glycérine :

Gélose nutritive simple et additionnée de 2, 5 et 10 p. 100 de glycérine.

Pour les milieux *liquides* :

Bouillon nutritif simple et additionné de 2, 5 et 10 p. 100 de glycérine, ainsi que milieu de Sauton.

Les ensemencements sur milieux de Dorset donnèrent des cultures tout aussi précoces sur milieu simple que sur milieu additionné de 2 et 5 p. 100 de glycérine, avec un retard de développement de plusieurs jours pour le milieu glycérimé à 10 p. 100. (Voir figures n^{os} 1 et 2.)

Des constatations semblables furent faites pour les ensemencements sur milieux à la pomme de terre simple et glycérimés jusqu'à 10 p. 100, soit apparition de petites colonies isolées dès le troisième au cinquième jour pour confluer en une nappe granitée, puis verruqueuse, s'épaississant progressivement au cours des semaines suivantes, pour atteindre leur maximum de développement après un mois environ.

Développement sensiblement le même sur pomme de terre simple et glycérimée à 2 et 5 p. 100, offrant un aspect très analogue à celui des cultures de bacilles tuberculeux, type humain, sur pomme de terre glycérimée. A nouveau, retard considérable avec milieu glycérimé à 10 p. 100. On observa également, dès la première semaine de culture, la formation d'une pellicule à la surface du milieu liquide occupant la partie inférieure des tubes à pomme de terre. Cette pellicule s'épaissit pour remonter ensuite sur les parois du tube. L'examen à la loupe binoculaire ($\times 50$ et 100) montra un voile verruqueux, rugueux, finement granité. (Voir figure n^o 3.)

L'examen microscopique comparé montra, tant pour les milieux de Dorset, pomme de terre non glycérimée que pour pomme de terre glycérimée, des bacilles acido-résistants à 5 p. 100 et 25 p. 100 de SO_4H_2 .

Sur pomme de terre-Sauton, mêmes caractères que pour pomme de terre glycérimée à 5 p. 100, mais culture plus blanchâtre. A la loupe binoculaire ($\times 50$), culture rugueuse, comme saupoudrée de farine blanchâtre.

Au microscope, éléments bacillaires allongés, plus ou moins grêles, résistant à 25 p. 100 de SO_4H_2 .

Gélose nutritive sans glycérine : développement plus lent de la culture ; après cinq-six jours, très fines colonies en tête d'épingle, grossissant très lentement, sans confluer, pour donner les colonies proéminentes de 1 à 2 mm. de diamètre. La culture conserve des caractères nettement dysgoniques sur ce milieu. Microscopiquement, éléments bacillaires courts, Gram-positifs, résistant à la décoloration par SO_4H_2 à 5 p. 100, mais faiblement acido-résistants à SO_4H_2 à 25 p. 100.

Gélose glycinée à 2 et 5 p. 100 : culture sensiblement plus précoce, mais présentant encore des caractères dysgoniques. Microscopiquement : bacilles acido-résistants à 25 p. 100 de SO_4H_2 .

Sur gélose glycinée à 10 p. 100 : retard considérable de l'apparition des cultures.

CULTURES SUR MILIEUX LIQUIDES.

MILIEU DE SAUTON. — L'ensemencement en surface de ballons de milieu de Sauton, à partir de fragments de pellicules développées à la surface du milieu de Sauton dans le renflement intérieur du tube de pomme de terre-Sauton donna un développement rapide ; les fragments ensemencés envahissent la surface du milieu du ballon, se réunissant pour former une pellicule continue couvrant, en une semaine, toute la surface du milieu (9 cm. de diamètre).

La pellicule fine s'épaissit alors, se plisse, et commence à remonter sur les parois du ballon. (Voir figure n° 4.)

Le maximum de développement est atteint après quatre à cinq semaines d'étuve ; le milieu reste clair.

Les caractères du voile sont sensiblement les mêmes, après trois semaines, que ceux des cultures sur Sauton de bacilles tuberculeux humains et bovins. L'examen microscopique de la pellicule fine en voie de développement montre des éléments bacillaires très longs et grêles, pour la plupart acido-résistants à 25 p. 100 de SO_4H_2 .

L'examen à un stade ultérieur de la pellicule après épaississement montre qu'elle est constituée d'éléments bacillaires très fortement acido-résistants, retenant intensément le Ziehl.

En dehors de cette culture en pellicule fine, nous avons également observé une culture en surface sous la forme d'un voile épais, se développant plus lentement, avec protubérances verruqueuses, et formée d'éléments bacillaires fortement acido-résistants. Bouillon glyciné : développement en surface de caractères sensiblement les mêmes que pour la culture sur Sauton.

STABILITÉ DES CARACTÈRES DE LA VARIANTE EUGONIQUE. — Depuis le 25 septembre 1947, date à laquelle cette souche de bacille tuberculeux type murin a présenté les nouveaux caractères eugoniques décrits ci-dessus, après passage chez *Apodemus sylvaticus*, elle a été entretenue par repiquages à 37° C, effectués, pour les besoins de l'expérience, à intervalles variant de cinq jours à quatre mois sur les milieux suivants : Dorset non glyciné et glyciné à 5 p. 100, pomme de terre non glycinée et glycinée à 5 p. 100, pomme de terre-Sauton, gélose simple et glycinée à 5 p. 100.

La pureté de la souche et ses caractères macroscopiques et microscopiques ont été contrôlés minutieusement lors de chaque repiquage. Actuellement, après une période de conservation de plus de deux ans de cette culture à 37°, les caractères eugoniques acquis par cette variante eugonique du bacille tuberculeux type murin se sont conservés sans changement appréciable sur les divers milieux sus-mentionnés et peuvent se résumer comme suit :

Apparition précoce des colonies deux-trois jours après ensemencement sur milieux non glycinés et glycinés à 2 et 5 p. 100. Retard marqué sur les milieux glycinés à 10 p. 100.

Dans l'ensemble, cultures aussi abondantes, sinon plus, sur milieux glycinés à 2 et 5 p. 100 que sur milieux non glycinés.

Microscopiquement, il fut observé également, au cours de la première semaine, une acido-résistance partielle qui s'accroît pour acquies les caractères d'une acido-résistance typique au stade ultérieur des cultures.

De légères différences dans la coloration des cultures, allant du blanc crème à une teinte jaunâtre, furent observées au cours des passages sur Dorset glyciné et non glyciné. Ces différences ne paraissent pas devoir être retenues comme un caractère permanent, mais paraissent plutôt de nature analogue à celles observées avec diverses souches de mycobactéries et semblent être en rapport avec la constitution du milieu nutritif ou correspondre à des phases d'adaptation de ces bacilles.

CULTURES A 25° ET 19-20° C.

Nous avons étudié les caractères d'adaptation et culturels de cette variante eugonique aux températures respectives de 25° et 19-20° C.

CULTURES A 25° C. — Des repiquages ont été pratiqués à partir de la culture entretenue à 37°, sur les milieux de Dorset, pomme de terre et gélose, non glycinés et glycinés à 2 p. 100, 5 p. 100 et 10 p. 100 respectivement.

L'apparition des premières colonies fut observée deux à trois jours après l'ensemencement, sans différences appréciables pour les divers milieux non glycinés et glycinés à 2 et 5 p. 100 ; retard de plusieurs jours pour ceux contenant 10 p. 100 de glycérine.

Il en fut de même pour les cultures sur milieux liquides. Dans l'ensemble, développement progressif sans caractères distinctifs culturels et de colorabilité des cultures à la température de 37° C.

CULTURES A 19-20° C. — 1° A partir de la souche cultivée à 25° C, sur les mêmes milieux que ceux indiqués pour les expé-

riences mentionnées ci-dessus, dans l'ensemble, retard de un à trois jours sur l'apparition des cultures entretenues à 25° C.

2° L'ensemencement effectué à partir des cultures entretenues à 37° C sur les mêmes milieux à 19-20° eut pour résultat un retard nettement plus prolongé, de quatre à cinq jours, à partir de la date d'ensemencement, sans différence pour les milieux non glycélinés et glycélinés.

POUVOIR PATHOGENE.

Nous avons pensé qu'il était intéressant de rechercher si le pouvoir pathogène de cette variante de bacille murin avait éventuellement subi quelques modifications à la suite de l'apparition de ces caractères eugoniques. En mars 1948, soit après six mois de culture sous cette forme eugonique, nous avons procédé à l'inoculation d'une série de rongeurs de laboratoire *non réceptifs* à l'égard du bacille tuberculeux murin (lapins et cobayes), afin de voir si cette variante eugonique avait éventuellement acquis un pouvoir pathogène pour ces rongeurs.

L'injection de 0,1 mg. de bacilles vivants par voie sous-cutanée ou intraveineuse chez le lapin d'élevage, de même que chez deux lapins sauvages (lapins de garenne : *Orytolagus cuniculus*), se montra aussi bien tolérée que celle de la souche originale dysgonique de ce bacille murin. Tous ces animaux augmentèrent de poids et ne présentèrent aucun signe local ou de réaction ganglionnaire satellite ou autre appréciable. Ils furent sacrifiés entre le douzième et le seizième mois suivant l'injection. L'autopsie ne présenta aucune lésion suspecte de tuberculose ; de même, absence de bacilles acido-résistants sur les frottis des organes (rate, foie, poumons) examinés systématiquement.

Il en fut de même pour une série de cobayes soumis à l'injection sous-cutanée de 0,01 à 0,1 mg. de cette même variante eugonique.

En avril 1949, nous avons procédé à l'injection d'une série d'animaux : rongeurs réceptifs au bacille murin dysgonique, comprenant un groupe de :

7 souris des bois (*Apodemus sylvaticus*), dont 5 reçurent 0,0001 mg. de culture par voie sous-cutanée et 2 autres 0,0001 mg. par voie intraveineuse ;

6 hamsters (*Cricetus aureus*), dont 3 reçurent 0,001 mg. par voie intrapéritonéale et 3 autres 0,1 mg. par injection sous-cutanée ;

2 loirs (*Glis glis*) reçurent 0,1 mg. par voie sous-cutanée.

Par ailleurs :

6 cobayes furent injectés avec 0,1 mg. du même passage de cette culture eugonique, dont 3 par voie intrapéritonéale et 3 par voie sous-cutanée.

Il ne fut remarqué, au cours de la période d'observation de huit mois comportant cette expérience, de lésions apparentes, cutanées, sous-cutanées ou ganglionnaires de tuberculose, type murin, ou autres, chez aucun des animaux ainsi inoculés.

En novembre 1949, soit huit mois après l'inoculation :

6 souris des bois sur 7 étaient encore vivantes (1 inoculée avec 0,0001 mg. par voie sous-cutanée mourut sans lésion suspecte).

1 loir ayant reçu 0,1 mg. par voie sous-cutanée mourut le 10 juillet 1949 sans lésion suspecte, un deuxième loir le 9 mai 1949. Ces animaux, comme les précédents, étaient exempts de lésions tuberculeuses apparentes ; absence de bacilles acido-résistants à la coloration de Ziehl des organes internes.

Tous les animaux survivants furent soumis à des épreuves de tuberculinisation ainsi qu'il sera exposé ultérieurement.

La moitié des animaux ayant survécu furent ensuite sacrifiés. Chez ces derniers, comme chez les précédents, il ne fut observé de lésions suspectes de tuberculose murine ou d'autre type de tuberculose.

Donc, chez aucun des animaux de ces deux séries, il ne fut observé soit de leur vivant, soit à l'autopsie, de lésions suspectes de tuberculose ou infiltrations de nature tuberculeuse qui puissent être mises éventuellement en évidence par la présence de bacilles acido-résistants sur frottis des organes internes.

On doit donc conclure de ces expériences, que non seulement la transformation de la souche de caractères dysgoniques en eugoniques n'a pas augmenté sa virulence pour les rongeurs, cobayes et lapins, non réceptifs au bacille murin dysgonique, mais que cette transformation semble au contraire s'être accompagnée d'une diminution nette du pouvoir pathogène pour les animaux sensibles envers la souche dysgonique originale, tels que la souris des bois et le hamster.

POUVOIR TUBERCULINIQUE DE LA VARIANTE EUGONIQUE, TYPE MURIN, DU BACILLE TUBERCULEUX.

Nous avons recherché le pouvoir tuberculinique de cette variante eugonique.

Les milieux de culture, en voile de cinq semaines de ladite variante eugonique sur Sauton et bouillon glycérimé à 5 p. 100, furent filtrés sur bougie Chamberland L₅. Le filtrat stérile ainsi obtenu, additionné de merthiolate dans les proportions de 1 : 20.000, fut utilisé comme produit tuberculinique et injecté par voie intradermique sous le volume de 0,1 cm³, soit pur, soit à des dilutions de 1/10 à 1/100 chez les animaux soumis antérieurement aux injections de la même variante eugonique de bacille tuberculeux, type murin, selon les modalités suivantes :

EXPÉRIENCE I. — 4 cobayes inoculés le 8 avril 1949 avec 0,1 mg. de bacilles vivants de la variante eugonique du bacille tuberculeux, type murin, furent soumis trente-deux jours plus tard à l'injection intradermique de 0,1 cm³ de la dilution à 1/100 du filtrat, variante eugonique de bacille tuberculeux, type murin.

Sept jours plus tard, ils furent réinjectés par voie intradermique également avec 0,1 cm³ du même filtrat, non dilué.

Les résultats de ces épreuves sont exposés dans le tableau I.

TABLEAU I. — Réactions cutanées chez les cobayes injectés avec le filtrat de culture variante eugonique de bacille tuberculeux type murin, trente-deux et trente-neuf jours après l'injection de 0,1 mg de cette dernière culture.

NUMÉRO du cobaye	FILTRAT DU BACILLE TUBERCULEUX type murin variante eugonique diluée au 1/100 Réactions observées en millimètres			FILTRAT DU BACILLE TUBERCULEUX type murin variante eugonique non diluée Réactions observées en millimètres		
	Après 24 heures	Après 48 heures	Après 95 heures	Après 24 heures	Après 48 heures	Après 96 heures
1	7	12	6	12	15	12
2	5	7	5	7	7	8
3				3	4	3
4	5	8	7	3	4	4

De l'examen de ces épreuves, il ressort donc nettement que l'inoculation de bacilles tuberculeux murins, variante eugonique, est capable de sensibiliser le cobaye envers l'injection ultérieure, effectuée cinq semaines plus tard, de filtrat de cette culture sur milieux liquides de ce même bacille.

Ces mêmes animaux furent soumis le 26 septembre 1949, soit cinq mois et dix-huit jours après inoculation, à une double épreuve de tuberculinisation :

1° Avec une dilution au 1/10 de filtrat de culture de bacille tuberculeux murin eugonique utilisé dans l'expérience précédente ; puis, quarante-huit heures plus tard, avec 0,1 cm³ du même filtrat pur ;

2° Avec une dilution de vieille tuberculine, type humain (A. T.) au 1/100 (100 U.).

Les épreuves furent effectuées, pour chaque animal, par voie intradermique — sous volume de 0,1 cm³ — après épilation dans la région dorsale, de chaque côté de la colonne vertébrale.

Par ailleurs, 4 souris des bois (*Apodemus sylvaticus*) inoculées à la même date que les cobayes mentionnés ci-dessus,

avec 0,0001 mg. de bacilles tuberculeux murins vivants, variante eugonique, furent également soumises à deux épreuves :

1° Avec filtrat de culture, variante eugonique de bacille tuberculeux, type murin, au 1/10 ;

2° Avec 0,1 cm³ de dilution de tuberculine vieille (A. T.), dilution au 1/100 (100 U.).

Les résultats consignés dans le tableau II mettent en évidence, chez les animaux injectés, un état allergique à l'égard du filtrat de bacille tuberculeux, type murin, ainsi que pour la tuberculine vieille (A. T.).

TABLEAU II. — Réactions cutanées chez les cobayes et les souris des bois à l'injection intradermique de filtrat de bacille tuberculeux murin, variante eugonique, et de tuberculine (A. T.) après injection de culture de bacille tuberculeux murin, variante eugonique.

NUMÉRO du cobaye	FILTRAT du bacille tuberculeux murin eugonique au 1/10 Réactions observées en millimètres		FILTRAT du bacille tuberculeux murin non dilué Réactions observées en millimètres		VIEILLE TUBERCULINE diluée au 1/100 (100 U.) Réactions observées en millimètres	
	Après 24 heures	Après 48 heures	Après 24 heures	Après 48 heures	Après 24 heures	Après 48 heures
1	3	3	8	14	7	4
2			15	16	8	6
3		3	11	7		3
4			10	8	4	3
SOURIS des bois						
1	12-14	12-14			12-14	12-14
2	12-14	12-14			12-14	12-14
3	12-14	12-14			12-14	12-14
4	12-14	12-14			12-14	12-14

EXPÉRIENCE II. — 3 cobayes inoculés le 9 mai 1948 avec 0,1 mg. de bacille tuberculeux, type murin, variante eugonique, furent soumis le 3 octobre 1949, soit seize mois et vingt-quatre jours après cette inoculation, à une double épreuve intradermique avec les produits suivants :

1° Filtrat de bacille tuberculeux murin, variante eugonique, au 1/10 ;

2° Tuberculine vieille (A. T.) au 1/100.

Quarante-huit heures plus tard, ces mêmes animaux furent soumis à une deuxième épreuve intradermique avec 0,1 cm³ de filtrat pur de bacille tuberculeux murin.

Les résultats de ces épreuves sont exposés dans le tableau III.

TABLEAU III. — Réactions cutanées chez les cobayes à l'injection de filtrat de bacille tuberculeux murin, variante eugonique, seize mois et vingt-quatre jours après injection de 0,1 mg. de bacille tuberculeux murin, variante eugonique.

NUMÉRO du cobaye	FILTRAT du bacille tuberculeux murin variante eugonique au 1/10 ^e Réactions observées en millimètres		FILTRAT du bacille tuberculeux murin non dilué Réactions observées en millimètres		VIEILLE TUBERCULINE diluée au 1/100 Réactions observées en millimètres	
	Après 24 heures	Après 48 heures	Après 24 heures	Après 48 heures	Après 24 heures	Après 48 heures
1	6	7	10	15	9	9
2	4	7	10	16	7	7
3	4	8	10	11	5	8

Il ressort de l'analyse de ces épreuves tuberculiniques effectuées cinq et seize mois après l'inoculation avec le bacille tuberculeux murin, variante eugonique, que la majorité des cobayes injectés avec 0,1 mg. de la variante eugonique réagissent par une réaction allergique nette envers le filtrat de la même variante eugonique, et de façon analogue envers la tuberculine vieille (A. T.).

Par ailleurs, les souris des bois inoculées avec des doses mille fois inférieures de bacille de la même variante eugonique correspondant à 0,0001 mg. réagissent très intensément envers des doses semblables de filtrat de la variante eugonique murine ainsi qu'envers la vieille tuberculine brute injectée dans les concentrations indiquées.

Il apparaît donc que bien qu'ayant perdu ses caractères pathogènes pour la souris des bois, la variété eugonique du bacille tuberculeux murin a conservé son pouvoir allergisant envers cette espèce de rongeurs originellement sensibles au bacille tuberculeux murin dysgonique.

CONCLUSIONS.

Au cours d'études expérimentales effectuées avec le bacille tuberculeux, type murin, chez la souris des bois (*Apodemus sylvaticus*), il fut isolé, à partir de lésions nécrotiques résultant de cette infection expérimentale, une variante de caractère eugonique de ce même bacille.

Cette variante est caractérisée par un développement considérablement plus précoce, plus rapide et plus abondant que la souche originale sur les divers milieux non glycélinés et glycélinés, solides et liquides, soit Dorset simple et glycéliné à 2 et 5 p. 100 ; milieux de pomme de terre ; bouillon simple glycéliné dans les mêmes proportions, de même que milieu de Sauton. Contrairement aux difficultés de croissance rencontrées dans les essais de culture en surface, en milieux liquides, par le bacille tuberculeux type murin original, cette variante eugonique se développe aisément en pellicules fines ou épaisses, repiquables en série et de caractères semblables à ceux des cultures en surface des bacilles tuberculeux, types humain et bovin.

Microscopiquement, le bacille de cette culture, variante eugonique, présente des caractères morphologiques et d'acido-résistance semblables à ceux de la souche dysgonique originale.

Cette variante eugonique se développe à 25° avec un certain retard qui est augmenté à 19-20°, à une période de quatre à sept jours d'ensemencement.

L'injection de 0,0001 mg. à 0,1 mg. de cette variante eugonique de bacille tuberculeux type murin, aux cobayes et lapins par voie intrapéritonéale et sous-cutanée, de même qu'aux rongeurs, tels que la souris des bois, voisine du campagnol, espèce naturellement sensible aux bacilles tuberculeux murins, et aux hamsters dorés, paraît indiquer que cette souche n'a pas acquis sous cette variante eugonique, une augmentation de virulence pour les animaux naturellement sensibles ou non sensibles à la souche originale dysgonique de ce bacille.

Il apparaît, au contraire, que le pouvoir pathogène s'est considérablement atténué et que la souche de caractère eugonique est devenue avirulente pour les hamsters à la dose de 0,1 mg. ainsi que pour les souris des bois, à la dose de 0,0001 mg.

Le filtrat de cultures de cinq semaines sur milieu de Sauton et bouillon glycéliné injecté, soit pur, soit à une dilution atteignant le 1/100, provoque, dès la cinquième semaine après l'inoculation de 0,1 mg. de cette variante eugonique, une réaction cutanée allergique de caractère tuberculinique, indiquant que ces animaux ont été rendus allergiques par cette injection de bacille eugonique, dénué de virulence pour ces derniers. Cette réaction allergique se maintient au cours de la deuxième année suivant l'inoculation de cette variante eugonique de bacille tuberculeux, type murin (1).

(1) Nous désirons exprimer nos remerciements à M^{lle} J. Spahr pour son assistance technique, de même qu'au D^r V. Bonifas pour les documents photographiques accompagnant ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WELLS (A. Q.). *Lancet*, 1937, **1**, 1221.
- [2] GRIFFITH (A. S.). *J. Hyg. Camb.*, 1942, **42**, 527.
- [3] GRIFFITH (A. S.) et DALLING (T.). *J. Hyg. Camb.*, 1940, **40**, 673.
- [4] IRWIN (D.) et O'CONNELL (D. C.). *Canad. med. Ass. J.*, 1943, **48**, 486.
- [5] CORPER (H. J.) et COHN (M. L.). *Am. J. Clin. Path.*, 1943, **13**, 18.
- [6] GRASSET (E.), MURRAY (J. F.) et DAVIS (D. H. S.). *Am. Rev. Tub.*, 1946, **53**.
- [7] WELLS (A. Q.). *Med. Res. Council*, 1946, Spec. Rep. Series n° 259.
- [8] DUBOS (R. J.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1945, **58**, 361.

DÉTERMINATION DES TYPES DE STAPHYLOCOQUES PAR L'AGGLUTINATION

par P. MERCIER, J. PILLET et M^{me} P. CHABANIER (*).

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

Il y a vingt ans encore, il était classique d'apprécier le pouvoir pathogène d'un staphylocoque par diverses épreuves telles que la pigmentation, la liquéfaction de la gélatine, la fermentation de certains glucides. En réalité, ces épreuves se sont avérées peu fidèles et on leur a substitué, à juste titre, d'autres critères, en particulier, le test de la coagulase entrevu par Delezenne [1], et appliqué à la détermination de l'aptitude pathogène du staphylocoque par Cruickshank [2], Cowan [3], Fairbrother [4], Kourilsky et Mercier [5]. Dans le même but, on a fait appel à des méthodes sérologiques, en particulier, aux réactions de précipitation. Julianelle et Wieghard [6], opérant avec des extraits bactériens bruts et des polyosides, divisent les staphylocoques en deux groupes : les pathogènes et les saprophytes. Deux ans plus tard, Thompson et Khorazo [7] peuvent ajouter un autre groupe parmi les non-pathogènes et, en 1938, Cowan [8], également à l'aide de réactions de précipitation, a montré qu'une subdivision du groupe des staphylocoques pathogènes était probable. A vrai dire, en employant la méthode d'absorption des agglutinines, Hine, dès 1922 [9], Blair et Hallman, en 1936 [10], avaient classé les staphylocoques pathogènes en 3 types et en 1936, également, Yonemura [11] put répartir 324 souches de staphylocoques en 9 types sérologiques. En 1939, Cowan [12], usant de l'agglutination sur lame, a montré que la majorité des staphylocoques pathogènes pouvait être différenciée en 3 types. Ce travail fondamental a été développé par Christie et Keogh [13] qui adjoignent 6 types nouveaux aux 3 précisés par Cowan et par Hobbs [14], qui porte à 13 le nombre des types. Enfin, la différenciation par les phages a été introduite par Fisk [15], approfondie par Wilson et Atkinson et tout récemment étudiée en France par Wahl et Lapeyre [16].

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} décembre 1949.

Dans le présent travail, nous nous proposons de classer une centaine de souches de staphylocoques, tant pathogènes que non pathogènes, par la méthode d'agglutination sur lame préconisée par Cowan. C'est d'ailleurs l'étude de cet auteur sur les types de staphylocoques qui nous servira de base pour les recherches que nous entreprenons. Si, en effet, les travaux de Christie et Keogh et de Hobbs précisent d'intéressants points de la technique d'agglutination, il nous a été possible de reclasser dans un des types I, II et III déterminés par Cowan, certaines souches différenciées par Christie dans un des types supplémentaires qu'il a créés. Christie lui-même, à qui nous sommes redevables de la série complète des types I à IX, nous a confirmé l'instabilité de certains d'entre eux [47]. Pour cette raison, nous ne pouvons retenir intégralement les conclusions de Hobbs qui maintient les types IV à IX proposés par Christie.

L'intérêt de ce travail n'est pas seulement d'ordre théorique. Si des précisions peuvent être apportées sur la structure antigénique des staphylocoques, certains problèmes concernant la pathogénie, l'épidémiologie et même la thérapeutique pourraient être résolus. Mais pour parvenir à ce résultat, il faut, d'une part, que les types sérologiques déterminés par l'agglutination soient suffisamment stables et que, d'autre part, la technique d'agglutination soit aussi simple et rapide que possible pour permettre d'effectuer des tests en série.

MATÉRIEL. — Nous avons étudié 100 souches de staphylocoques (*) isolées depuis quinze jours à deux mois, soit 57 provenant de lésions humaines : furoncles, ostéomyélite, 15 non pathogènes, issues de fosses nasales et 28 pathogènes, d'origine animale β ou α - β toxiques, isolées à partir d'abcès, de mammites, etc.

Ces différentes souches ont été repiquées sur gélose inclinée, une ou deux fois après leur isolement et conservées ensuite en gélose profonde.

Avant d'effectuer les épreuves d'agglutination, nous avons recherché les propriétés biologiques de ces 100 souches : coagulase, fermentation du mannitol et hémolysines α et β . Les souches pathogènes d'origine humaine coagulaient le plasma oxalaté de lapin, fermentaient le mannitol en quarante-huit heures au plus et donnaient sur boîtes de gélose au sang de lapin

(*) Nous remercions particulièrement le Dr René Bénard, médecin de l'hôpital Poincaré ; le Dr A. Bocage, médecin assistant de l'hôpital Saint-Louis ; le professeur Guilhaud, de l'Ecole d'Alfort et notre collègue, le Dr A. Bonnefoi, de nous avoir facilité la collecte de ces souches.

l'image caractéristique de l'hémolysine α . Les souches nasales ne présentaient aucun de ces caractères. Quant aux souches d'origine animale, l'épreuve positive de la coagulase, et la mise en évidence de l'hémolysine β , seule ou associée à l' α , permettaient de les considérer comme pathogènes. Nous n'avons jamais tenu compte de la pigmentation qui est un test de pathogénèse bien peu sûr, en raison de la fréquence des staphylocoques blancs parmi les pathogènes. Nous en avons apporté la preuve antérieurement [18 et 19].

TECHNIQUES. — Les sérums agglutinants ont été préparés chez des lapins de 2 kg. environ, dans les conditions suivantes : avant les injections, les agglutinines naturelles, présentes dans le sérum de chacun des animaux, furent titrées à l'égard des souches de staphylocoques des types I, II et III, d'origine humaine, isolées par Cowan, par la méthode d'agglutination sur lame décrite par cet auteur. Les taux oscillent du 1/5 au 1/20 et peuvent atteindre, rarement il est vrai, le 1/50. Cette notion doit être retenue, car des sérums utilisés à des dilutions égales ou inférieures à 1/50 peuvent renfermer des agglutinines ne répondant pas strictement aux antigènes injectés, et, de ce fait, leur usage pourrait engendrer des erreurs dans les épreuves de classification. A noter que Cowan, Christie et Hobbs utilisent des sérums dilués au 1/5. Les lapins isolés avant les inoculations et maintenus dans un état de propreté aussi rigoureux que possible reçurent des suspensions en eau physiologique des souches de types I, II et III de Cowan (1). Ces suspensions furent préparées à partir de culture sur gélose inclinée de dix-huit heures, tuées par la chaleur à 100° durant cinq minutes, lavées trois fois et reprises par l'eau physiologique de manière telle que 1 cm³ renferme 6 milliards de germes. Chacune des 3 souches fut injectée, durant quatre semaines, par voie veineuse, à un groupe de lapins, au rythme de 3 injections hebdomadaires, suivies de quatre jours consécutifs de repos, en commençant par 0,5 cm³ d'antigène et en augmentant de 1/2 cm³ chaque semaine, pour terminer par 2 cm³ à la quatrième semaine.

Huit jours après la dernière injection, les animaux furent saignés et le sérum a été conservé à basse température, additionné de merthiolate au 1/10.000 (2). Nous avons alors procédé

(1) Nous remercions sincèrement le Dr S. T. Cowan d'avoir bien voulu nous faire parvenir ses souches.

(2) Le merthiolate, spécialisé sous le nom de *Merseptyl*, a été mis à notre disposition par les laboratoires du Dr Quesneville, à qui nous adressons nos vifs remerciements. Les sérums, conservés avec cet antiseptique, ont maintenu leurs propriétés agglutinantes à peu près intactes plus de six mois après leur préparation.

au titrage des agglutinines contenues dans chaque sérum, à l'égard des 3 types de Cowan et pour les tests de classification, nous avons mélangé les sérums de même type et recherché à nouveau le taux d'agglutination.

ABSORPTION DES SÉRUMS. — Nous avons suivi la technique de Cowan avec les modifications suivantes : les sérums furent dilués au 1/50 pour la raison indiquée ci-dessus, et nous avons absorbé des quantités de sérum beaucoup plus grandes, 20 cm³ en moyenne traités par les cultures obtenues sur une ou plusieurs boîtes de Roux. Les tubes à centrifuger contenant les germes absorbants et le sérum furent agités toutes les demi-heures, pendant leur séjour d'une heure et demie à l'étuve. Les sérums furent absorbés par les souches hétérologues, c'est-à-dire le sérum I respectivement par une souche du type II et par une souche du type III, le sérum II par une souche du type I et par une souche du type III et le sérum III par les souches des types I et II. Les contrôles d'absorption effectués sur le liquide sur-nageant s'appliquèrent à la recherche des agglutinines à l'égard de la souche homologue au sérum — et dans ce cas, l'agglutination devait être rapide et complète — et à l'égard de la souche absorbante, celle-ci devant être absolument négative. Dans le cas contraire, l'absorption devait être répétée jusqu'à disparition des agglutinines vis-à-vis de la souche absorbante.

PRÉPARATION DES SUSPENSIONS BACTÉRIENNES À CLASSER. — Pour en déterminer le type, il y a intérêt à prendre des souches fraîches, mais ayant subi 2 ou 3 repiquages en gélose profonde. Nous avons réensemencé ces souches en bouillon nutritif, et après dix-huit heures de culture à 37° et lavage, nous avons repris les germes en eau physiologique, environ 0,8 cm³ d'eau par tube de 10 cm³ de culture.

ÉPREUVE D'AGGLUTINATION SUR LAME. — Sur une lame parfaitement propre, on dépose avec une pipette Pasteur, 1 goutte de sérum dilué au 1/50 et, avec une autre pipette de même diamètre, 1 goutte de la suspension à tester. La lame est agitée d'un mouvement circulaire pendant un temps variable de cinq à quinze minutes, selon les souches. Les souches pathogènes d'origine humaine furent testées au bout de cinq minutes, mais les souches non pathogènes d'origine humaine et les souches d'origine animale β -toxiques, plus lentes à agglutiner, furent éprouvées après quinze minutes de contact avec le sérum. Les degrés croissants d'agglutination sont notés dans les tableaux ci-après par les signes + à + + + +. Le symbole O traduit l'absence complète de réaction d'agglutination.

RÉSULTATS.

EPREUVES D'AGGLUTINATION AVEC LES SÉRUMS NON ABSORBÉS. — Les lapins répondent d'une manière fort variable aux injections d'antigène bactérien, c'est là un fait d'expérience souvent relaté : le taux d'agglutination des *souches pathogènes d'origine humaine* obtenu avec les sérums non absorbés des types I, II et III de Cowan (préparés, rappelons-le, à partir de souches humaines, pathogènes) varie de 1/100 à 1/10.000. Les taux les plus élevés sont habituellement donnés par la souche homologue à celle du sérum, mais on note assez fréquemment des taux équivalents avec des souches hétérologues. A titre d'exemple, le sérum du type III agglutine directement sa souche homologue et une souche du type I avec la même intensité (1/1.500). Tout au plus, la mise en évidence d'un taux d'agglutination très élevé à l'égard d'une souche donnée par un des sérums non absorbés des 3 types est-elle un élément de présomption, mais non un facteur de certitude en faveur de l'identité de la souche étudiée et de celle correspondant au sérum. Nous verrons plus loin si l'absorption des agglutinines permet une classification plus précise. Nous remarquerons en passant que les suspensions bactériennes destinées à l'agglutination, tuées par l'ébullition, donnent des résultats aussi satisfaisants que des cultures vivantes, et nous préférons les cultures d'une nuit à celles ayant séjourné trois à quatre heures à l'étuve.

Les *souches non pathogènes* ne réagissent généralement pas à l'action des antisérums I, II et III. Sur les 15 souches de cette catégorie, 3 agglutinaient au maximum au 1/100 avec le sérum non absorbé III, 1 au 1/200 et 1 au 1/600, également avec le sérum du type III. Le taux d'agglutination maximum obtenu à l'égard de ces 5 dernières souches avec les sérums des types I et II et celui de toutes les autres souches non pathogènes par les sérums non absorbés des 3 types ne dépassent pas le 1/20. La structure antigénique des souches saprophytes apparaît donc profondément différente de celle des souches pathogènes d'origine humaine. Les résultats apparaissent plus nuancés si l'on soumet à l'agglutination directe des *souches pathogènes d'origine animale*. Alors que le taux d'agglutination de certaines d'entre elles atteint le 1/1.000, d'autres souches réagissent au 1/200 ou au 1/100, alors que d'autres encore ne sont pas agglutinées au 1/10. Compte tenu du nombre relativement restreint des souches étudiées, il paraît impossible de classer ces souches par l'agglutination directe même approximativement ; tout au plus il paraît ressortir de nos observations qu'elles sont généralement agglutinées plus fortement avec le sérum non absorbé du type III. Mais l'étude d'un plus grand nombre de souches est nécessaire

pour étayer ou infirmer ce résultat et l'absorption des agglutinines s'avère indispensable pour tenter de réaliser une classification précise.

RÉACTIONS D'AGGLUTINATION AVEC LES SÉRUMS ABSORBÉS. — Sur 57 souches pathogènes d'origine humaine, 17 agglutinaient seulement avec l'antisérum du type I, 20 seulement avec l'antisérum du type II, et 3, seulement avec l'antisérum du type III. 13 souches réagissent avec 2 sérums, mais il était possible de déterminer quel sérum provoquait la plus forte agglutination.

Nous considérons ces dernières souches comme mixtes et nous les notons en indiquant d'abord l'agglutination la plus forte, comme Christie l'a préconisé [43].

A titre d'exemple, nous donnons dans le tableau I les résultats obtenus à l'égard de quelques souches d'origine humaine, en mentionnant les sérums employés et en portant entre parenthèses le type de la souche absorbante.

TABLEAU I.

NUMÉRO des souches étudiées	TYPE DES SÉRUMS						Classification
	Sérum I (II)	Sérum I (III)	Sérum II (I)	Sérum II (III)	Sérum III (I)	Sérum III (II)	
406	++++	++++	0	0	0	0	Type I.
448	++++	++++	0	0	0	0	Type I.
501	++++	++++	0	0	0	0	Type I.
399	0	0	+++++	+++++	0	0	Type II.
442	0	++	+++++	+++++	0	0	Type II.
509	0	0	+++++	+++++	0	0	Type II.
402	0	0	0	0	+++++	+++++	Type III.
373	++	0	0	0	+++++	+++++	Type III.
511	±	+	0	0	+++++	+++++	Type III.
408	++++	++++	++++	++++	0	0	Mixte I-II.
413	++++	++++	++++	++++	0	0	Mixte I-II.

Quatre souches seulement sur les 57 pathogènes d'origine humaine n'ont pas réagi avec les sérums absorbés des 3 types, cela malgré plusieurs repiquages ou après passage sur le lapin. Dans l'ensemble, 70 p. 100 des souches ont pu être classées à l'aide des sérums absorbés I, II et III et 22 p. 100 mixtes appartiennent à 2 ou 3 types.

Le tableau II résume la répartition des souches pathogènes humaines dans les divers types sérologiques.

La réaction d'agglutination à l'aide des sérums absorbés I, II et III appliquée aux 15 souches non pathogènes a été complètement négative, excepté pour la souche n° 538. L'agglutination

TABLEAU II.

RÉPARTITION DES 57 SOUCHES PATHOGÈNES D'ORIGINE HUMAINE							
Type I	Type II	Type III	Non classés	Mixtes			
				I-II	I-III	II-II	I-II-III
17	20	3	4	12	0	0	1

directe nous avait montré que le sérum III agglutinait cette souche au 1/600. L'absorption des agglutinines confirme ce résultat.

Toutes les autres souches, même celles qui agglutinaient au 1/100 et au 1/200 ne peuvent être classées par les sérums absorbés. Une fois encore, se trouvent confirmées les différences profondes dans la structure antigénique des staphylocoques saprophytes et celle des pathogènes. Nous n'avons pas préparé de sérums agglutinants à partir de souches non pathogènes et nous ne pouvons pas, en conséquence, déterminer si elles peuvent se classer dans un seul ou dans plusieurs types. Ce problème fera l'objet d'une étude ultérieure.

Il en sera de même avec les souches pathogènes d'origine animale. Sur les 28 souches étudiées, 5 seulement ont pu être placées dans un des types I, II ou III, soit 2 dans le type I, 2 dans le type II, la dernière appartenant aux types II, III. Mais nous ne présentons ces résultats qu'avec quelque réserve ; il semble cependant qu'il n'existe pas entre les souches pathogènes d'origine humaine et celles d'origine animale, une frontière aussi marquée dans l'équipement antigénique que celle observée entre les saprophytes et les pathogènes. De nouvelles recherches sont toutefois nécessaires dans ce domaine.

STABILITÉ DES TYPES SÉROLOGIQUES. — Cowan a observé que les souches des types I et II étaient remarquablement constantes dans leurs réactions durant une période de dix-huit mois, alors que celles du type III paraissaient plus variables. Nous n'avons pas noté, pour notre part, de telles variations dans les souches du type III. Nous avons pu classer une seconde fois la presque totalité des souches, un an après le premier examen. Deux seulement avaient pratiquement perdu leurs propriétés agglutinantes au bout de cette période. Après passage sur le lapin, ces souches, isolées du sang par ponction cardiaque, avaient retrouvé leur réaction d'agglutination initiale. Elles appartenaient l'une et l'autre au type II. Deux autres souches qui n'avaient pu être

agglutinées par les sérums absorbés des 3 types aussitôt après leur isolement présentaient la même réaction négative un an après, malgré passage sur l'animal. Nous n'avons jamais observé de transfert d'un type à un autre type au cours d'examens multiples pendant un an, et cela, quelle que soit l'origine des souches étudiées.

DISCUSSION.

Il paraît, à l'heure actuelle, hors de doute que l'on peut distinguer plusieurs types dans le groupe des staphylocoques pathogènes, et qu'il y a en outre une différence profonde dans la structure antigénique des saprophytes et des pathogènes. Les réactions d'agglutination par les sérums absorbés sont simples et rapides, mais elles doivent aussi être fidèles. A cet égard, les auteurs ne s'accordent pas sur le nombre de types : 3 pour Cowan, 9 pour Christie et Keogh, 13 pour Hobbs, pour ne citer que les travaux les plus récents. D'autres auteurs ont cru pouvoir effectuer une subdivision des 3 types de Cowan. Il y aurait 2 sous-types I : Ia et Ib et 4 sous-types III : IIIa, IIIb, IIIc, IIId. Ces sous-types n'apparaissent pas suffisamment spécifiques pour être actuellement introduits dans une classification précise ; cependant leur existence paraît probable mais implique de nouvelles recherches. Il ne nous semble pas possible, pour l'instant, de maintenir intégralement les types supplémentaires proposés par Christie et repris par Hobbs, puisque nous avons pu replacer certains d'entre eux dans la classification de Cowan et que, d'autre part, leur stabilité paraît douteuse.

C'est dire la nécessité d'études supplémentaires sur ce problème qui intéresse non seulement l'immunologie, mais également la clinique.

La structure antigénique des staphylocoques est, encore à l'heure actuelle, très mal connue. Le travail déjà ancien de Julianelle et de Wieghard (1935) [6] faisait état de l'existence de 2 polyosides différents dans le groupe des staphylocoques : l'un A, spécifique des pathogènes ; l'autre B, retrouvé seulement chez les non-pathogènes. Cette distinction est-elle suffisante ? Il ne le semble pas si l'on admet avec Julianelle que la spécificité du groupe staphylocoque revient à une protéine commune à l'ensemble de ces germes, les polyosides constitutifs séparant les saprophytes des pathogènes. En effet, ce point de vue ne rend pas compte de différences dans l'équipement antigénique des staphylocoques pathogènes, différences mises en évidence, en particulier par Cowan, et que notre travail confirme pleinement. Par ailleurs, des essais actuellement en cours dans notre laboratoire donnent à penser qu'il existe dans le groupe des staphylocoques pathogènes plusieurs polyosides spécifiques, et non pas un seul.

Cliniquement, l'existence de différents types de staphylocoques pathogènes peut permettre d'élucider certains problèmes, tant pathogéniques qu'épidémiologiques et thérapeutiques. Il suffit de se rappeler le rôle essentiel joué par les fosses nasales comme « réservoir de virus » staphylococcique, pour souligner toute l'importance d'une identification précise des types trouvés à leur niveau et dans la lésion elle-même (Williams et Timmins [20], Mercier et Pillet [21], Wahl et Lapeyre [46]). L'intérêt épidémiologique nous semble tout aussi évident, pour dépister les porteurs de germes responsables de la propagation si fréquente des staphylococcies dans les collectivités. Enfin, la thérapeutique de ces affections doit bénéficier directement d'une identification sérologique des germes en cause en introduisant dans les vaccins bactériens non pas des staphylocoques choisis au hasard, mais une gamme de germes répondant à tous les types antigéniques connus.

Dans un prochain travail, en collaboration avec Wahl et Lapeyre, nous comparerons la classification des types de staphylocoques pathogènes par la méthode des phages et par l'agglutination à l'aide de sérums absorbés, ces deux méthodes, employées conjointement, pouvant donner d'intéressantes indications sur la structure des staphylocoques.

RÉSUMÉ.

Alors que l'agglutination directe permet seulement de différencier les staphylocoques pathogènes des saprophytes, il est nécessaire d'avoir recours à l'agglutination avec des sérums absorbés pour distinguer les différents types de staphylocoques pathogènes. La grande majorité de ceux-ci (70 p. 100) peut être classée dans les 3 types bien définis, mis en évidence par Cowan, une faible proportion (22 p. 100) donnant des réactions positives avec des sérums absorbés de plusieurs types. L'existence de sous-types annoncée par divers auteurs ne nous paraît pas actuellement démontrée. Les staphylocoques pathogènes d'origine animale réagissent plus difficilement avec les sérums absorbés des 3 types, cependant un petit nombre a pu être classé et il ne semble pas qu'il y ait de différences antigéniques fondamentales entre eux et ceux isolés chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DELEZENNE (C.). *Arch. Physiol. Norm. Path.*, 1898, **10**, 508.
- [2] CRUICKSHANK (R.). *J. Path. a. Bact.*, 1937, **45**, 295.
- [3] COWAN (S. T.). *J. Path. a. Bact.*, 1938, **46**, 31.
- [4] FAIRBROTHER (R. W.). *J. Path. a. Bact.*, 1940, **4**, 83.

- [5] KOURILSKY (R.) et MERCIER (P.). *Rev. Immunol.*, 1942, **7**, 53.
- [6] JULIANELLE (L. A.) et WIEGHARD (C. W.). *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 11.
- [7] THOMPSON (R.) et KHORAZO. *J. Bact.*, 1937, **34**, 69.
- [8] COWAN (S. T.). *Loc. cit.*
- [9] HINE (T. G. M.). *Lancet*, 1922, **2**, 1380.
- [10] BLAIR (J. E.) et HALLMAN. *J. Bact.*, 1936, **31**, 81.
- [11] YONEMURA (N.). *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1936, **89**, 392.
- [12] COWAN (S. T.). *J. Path. a. Bact.*, 1939, **48**, 169.
- [13] CHRISTIE (R.) et KEOGH (E. V.). *J. Path. a. Bact.*, 1940, **51**, 189.
- [14] HOBBS (B. C.). *J. Hyg.*, 1948, **46**, 222.
- [15] FISK (R.) et MORDVIN (O.). *Am. J. Hyg.*, 1944, **40**, 232.
- [16] WAHL (R.) et LAPEYRE (P.). *Soc. Microb. Langue franç.*, séance du 3 novembre 1949.
- [17] CHRISTIE (R.). *Communication personnelle.*
- [18] PILLET (J.). Sur quelques produits élaborés par les staphylocoques pathogènes. *Thèse Fac. Méd. Paris*, 1948 (Foulon, éditeur).
- [19] KOURILSKY (R.), MERCIER (P.) et PILLET (J.). *Ann. Biol. Clinique*, 1949, **5-6**, 173.
- [20] WILLIAMS (S.) et TIMMINS (C.). *Med. J. Australia*, 1938, **2**, 687.
- [21] MERCIER (P.) et PILLET (J.). *Bull. Acad. Méd.*, 1948, **15-16**, 269.

NOUVELLES RECHERCHES SUR LES HÉMOLYSINES OXYDABLES

par MAYLIS GUILLAUMIE et A. KRÉGUER.

(Institut Pasteur. Service des Toxines gangréneuses.)

Il est admis depuis longtemps que l'activité hémolytique des cultures de *Cl. botulinum* des types A et B décroît rapidement à 37° et que l'action hémotoxique de la toxine botulinique disparaît lentement à la température du laboratoire.

D'après les traités de bactériologie, *Cl. sordellii* ne produit pas ou que peu d'hémolysine sur la gélose au sang ; ce germe élabore, dans des bouillons glucosés, une toxine extrêmement nocive *in vivo* : le maximum de toxicité de certaines cultures filtrées s'observe dans les quarante-huit heures qui suivent l'ensemencement des bouillons ; dans des milieux moins favorables, la toxicité maxima ne se produit que trois à cinq jours plus tard.

Clark et Hall (1937), Stewart (1938), E. M. Miles et A. A. Miles (1947) tendent à penser que *Cl. sordellii* est une variété toxinogène de *Cl. bifermentans* [1]. Dès 1943, Hayward a montré que la lécithinase élaborée par certaines souches de *Cl. bifermentans* et de *Cl. sordellii* est neutralisée par l'antitoxine *perfringens* α [2]. En appliquant la réaction de Nagler, McFarlane (1949) a constaté aussi que quelques souches de *Cl. sordellii* engendrent une lécithinase complètement neutralisable par l'antitoxine α ; d'après cet auteur, la réaction de Nagler produite par d'autres souches de *Cl. sordellii* n'est que partiellement inhibée par l'antitoxine α [3].

Récemment (1), A.-R. Prévot et J. Malgras ont signalé les faits suivants : la toxine préparée à 33° avec la souche 82 de *Cl. sordellii* est hémolytique et lécithinasique ; l'hémolysine de cette toxine n'est pas oxydable par l'eau oxygénée ; elle n'est pas activable par l'hydrosulfite de soude.

Au cours de nos recherches sur les propriétés hémolytiques de diverses toxines microbiennes, nous avons titré, il y a longtemps déjà, l'exotoxine d'une souche de *Cl. botulinum* C et de *Cl. sordellii*. Cette étude, que nous avons abandonnée un moment, nous l'avons

(1) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} décembre 1949.

reprise et étendue à de nouvelles souches de *Cl. botulinum* et *sordelli*. L'activité hémolytique des toxines a toujours été déterminée en présence de 0,1 cm³ d'une suspension à 5 p. 100 d'hématies lavées de mouton. Nous prenons comme dose minima hémolytique d'une toxine, la plus petite quantité de toxine qui lyse totalement les globules rouges employés.

TOXINE BOTULINIQUE.

1° Partant de la notion que l'anticorps d'une hémolysine oxydable est capable de neutraliser non seulement l'hémolysine homologue mais encore toute hémolysine hétérologue à condition qu'elle soit oxygène-labile, nous avons fait agir, au cours d'une expérience d'orientation, des sérums anti-*perfringens* A et anti-tétaniques sur une toxine botulinique que nous avons préparée le 6 mai 1947 avec une souche de *Cl. botulinum* type C de I. Bengston. Les sérums que nous avons choisis étaient très anti-hémolytiques, à la fois, vis-à-vis de l'hémolysine *perfringens* θ , de la tétanolysine et de l'histolysine ; vis-à-vis de notre préparation de toxine botulinique C, ils n'ont pas manifesté un pouvoir inhibiteur supérieur à celui des sérums normaux. Or, quinze jours plus tard, cette préparation avait perdu 94 p. 100 de son activité hémolytique et la cystéine employée à la dose de 1 p. 1.000 augmentait légèrement l'effet hémolytique de la toxine atténuée, ce qui permettait d'envisager la présence d'une hémolysine oxydable dans la toxine considérée. Mais, le fait que l'anti-hémolysine θ et l'anti-tétanolysine n'avaient pas agi à faible dose sur la toxine botulinique fraîchement préparée conduisait à supposer que l'hémolysine oxydable de cette toxine était accompagnée d'une hémolysine non oxydable. Etant donné, en outre, que nous avions ajouté à la toxine botulinique un sérum anti-*perfringens* contenant de l'antitoxine α on pouvait penser que cette antitoxine était sans action sur l'hémolysine non oxydable présumée.

2° Pour étudier de plus près les propriétés hémolytiques de l'exotoxine de *Cl. botulinum* type C, nous avons préparé, seize mois après l'essai que nous venons de mentionner, 5 toxines botuliniques avec plusieurs repiquages de la souche de I. Bengston. Les cultures, réalisées à 37° et avec des bouillons VI glucosés à 1 p. 1.000, ont été centrifugées vingt à vingt-deux heures après l'ensemencement des bouillons. La dose minima hémolytique (D. II.) des toxines, évaluée aussitôt après la centrifugation des cultures et quelques jours plus tard, a été recherchée selon notre procédé habituel, en présence d'eau physiologique ordinaire et d'eau physiologique tamponnée à pH 6,5 par des phosphates.

La D. II. des différentes toxines fraîchement préparées a varié entre 0,009 et 0,004 cm³. Les phosphates n'ont pas diminué

l'action hémolytique de ces toxines. Ainsi, la D. II. de la toxine préparée le 1^{er} septembre 1948 a été de 0,004 cm³, que le dosage soit fait en présence d'eau physiologique ordinaire ou d'eau physiologique additionnée de phosphates.

Après le titrage, les toxines ont été conservées à la température de 2° dans des tubes bouchés au coton. Leur action hémolytique a baissé très rapidement. L'une d'elles a perdu, en quarante-huit heures, 73 p. 100 de son activité et une autre 97 p. 100 ; une troisième toxine avait déjà perdu au bout de vingt-quatre heures 80 p. 100 de son activité.

Aux 5 toxines atténuées, nous avons ajouté 1 p. 1.000 de chlorhydrate de cystéine (1 mg. de chlorhydrate par centimètre cube de toxine). La cystéine a rétabli partiellement l'activité d'une toxine et totalement celle des 4 toxines restantes. Ces 5 préparations contiennent donc une hémolyse oxydable. Après oxydation au contact de l'air, cette hémolysine est réactivable par un réducteur.

Ensuite, nous avons successivement constaté les faits suivants : l'activité hémolytique des toxines activées par la cystéine est neutralisable par l'anti-hémolysine θ des sérums anti-*perfringens* ; l'activité hémolytique résiduelle des toxines atténuées est également supprimée par l'anti-hémolysine ; l'effet hémolytique de la toxine fraîchement préparée est aussi inhibé par l'anti-hémolysine θ ainsi que par l'anti-tétanolysine.

En effet, 17 D. H. de la toxine du 21 septembre 1948 sont inhibées par 0,001 cm³ du sérum anti-*perfringens* 415 et par 0,0001 cm³ du sérum anti-tétanique 1371. Précisons que ce sont ces deux sérums qui n'avaient pas neutralisé plus efficacement que des sérums normaux la préparation de toxine botulinique C faite seize mois auparavant.

Ainsi donc, les toxines que nous avons préparées à plus d'un an d'intervalle, avec des repiquages différents de la même souche de *Cl. botulinum* type C, diffèrent nettement. Une hémolysine non oxydable devait exister dans les plus anciennes alors que les préparations ultérieures ne contiennent qu'une hémolysine oxydable (2).

3° Nous avons examiné les propriétés des toxines préparées avec deux autres souches de *Cl. botulinum* type C : la souche 6060 reçue de Washington (National Type Culture Collection) et la souche C N 2749 que nous devons à l'obligeance de M. Oakley.

(2) Pendant la conservation, différents germes anaérobies subissent des transformations. En voici quelques exemples : *Cl. perfringens* type B perd avec le temps la propriété d'élaborer les antigènes γ et ϵ ; *Cl. perfringens* type C peut cesser d'engendrer β . Quant à *Cl. perfringens* type D, après six à huit mois de conservation en bouillon Vf, il n'élabore presque plus de toxine ϵ mais seulement de la protoxine ϵ [4].

Comme toujours, nous avons ensemencé des bouillons Vf glucosés à 1 p. 1.000. Les cultures faites à la température de 37° ont été centrifugées vingt-deux heures après l'ensemencement des bouillons et titrées. La toxine produite par la première souche n'a pas été hémolytique. Les toxines préparées avec la souche de M. Oakley ont manifesté une grande activité : leur dose minima hémolytique a été en effet égale à 0,002 et 0,001 cm³ ; l'une de ces préparations a perdu 92 p. 100 de son activité en vingt-quatre heures à 2° ; la cystéine à la dose de 1 p. 1.000 a totalement rétabli l'activité hémolytique initiale. D'après les épreuves sérologiques, l'effet hémolytique de cette toxine atténuée n'est pas neutralisable par l'antitoxine *perfringens* α ; il est, par contre, inhibé par des doses minimales de sérum anti-*perfringens* riche en anti-hémolysine θ ainsi que par les sérums anti-histolytiques. Les toxines fraîchement centrifugées sont neutralisées par les sérums contenant de l'anti-hémolysine θ ou de l'anti-histolysine. Ainsi, à la dose de 1/10.000 cm³ le sérum anti-histolytique 447 neutralise 15 D. H. de la toxine botulinique C préparée avec la souche C N 2749. La toxine examinée ne contient donc en quantité abondante que de l'hémolysine oxydable.

Avec la souche C N 2748 de *Cl. botulinum* type D de la collection de M. Oakley, nous n'avons pas encore obtenu, en seize heures à 37°, une toxine hémolytique pour les hématies de mouton.

TOXINE SORDELLII.

Comme souches de *Cl. sordellii*, nous avons utilisé la souche n° 1 conservée depuis trois ans dans du bouillon Vf contenant un petit cube de blanc d'œuf cuit et les souches 79 et 82 que nous conservons dans du bouillon Vf additionné de fragments de foie cuit.

Après avoir effectué avec la souche 1 un repiquage dans du bouillon Vf glucosé et avec les souches 79 et 82 quatre repiquages successifs dans ce bouillon, nous avons déterminé l'activité des toxines que ces souches élaborent aux températures de 31 et 37° dans divers milieux : bouillon Vf glucosé à 1 ou 2 p. 1.000 ; bouillon Vf additionné de 1 p. 1.000 de glucose et de 5 p. 1.000 de peptone 5 B ; bouillon Vf additionné de 1 p. 1.000 de glucose et de 2 p. 1.000 de sang desséché.

Nous avons préparé 18 cultures : 8 avec la souche 1, 2 avec la souche 79 et 8 avec la souche 82.

L'activité hémolytique des 18 cultures centrifugées est déterminée en présence d'eau physiologique tamponnée à pH 6,5 par des phosphates.

L'action létale de quelques toxines est recherchée par le procédé des injections intraveineuses et sous-cutanées à des souris blanches de 17 à 20 g. ; dans ces titrages, les toxines sont amenées aux dilutions voulues avec de l'eau physiologique ordinaire. Disons tout de suite

que la nocivité *in vivo* de ces toxines est supprimée par un sérum anti-*sordellii* que M. Marcel Raynaud a eu l'extrême obligeance de nous donner.

I. PROPRIÉTÉS HÉMOLYTIQUES DE LA TOXINE SORDELLII FRAICHEMENT PRÉPARÉE. — Le titre hémolytique des toxines est recherché aussitôt après la centrifugation des cultures. La centrifugation est faite soit seize heures après l'ensemencement des bouillons (quatorze fois), soit vingt-quatre heures (deux fois), soit cinq jours après l'ensemencement (deux fois). Nos résultats indiquent ceci :

a) Les toxines provenant des *cultures centrifugées après seize et vingt-quatre heures d'étuve à 37° sont hémolytiques*.

Les données numériques du tableau I montrent, par exemple, que la toxine 6 — engendrée en seize heures à 37° par la souche 82 dans du bouillon Vf glucosé et péptoné — est hémolytique à la dose de 0,007 cm³ ; la dose minima hémolytique de la toxine 10 préparée avec la souche 1 est égale à 0,015 cm³.

En comparant les doses minima hémolytiques de 6 toxines élaborées en seize heures à 37° aux doses minima hémolytiques des toxines préparées à 31° (tableau I), on voit que 2 toxines faites à 37° ont une activité égale à celle des cultures *correspondantes* développées à 31° ; 3 ont une activité un peu inférieure à celle des toxines à 31° ; une toxine a une action nettement inférieure à celle de la toxine obtenue à 31° dans le même bouillon.

Dans un de nos essais, une culture de la souche 82 centrifugée après vingt-quatre heures d'étuve à 37° est hémolytique à la dose de 0,006 cm³ ; cette toxine centrifugée contient une hémolysine oxydable et une lécithinase.

Le chlorhydrate de cystéine n'augmente pas le pouvoir hémolytique des toxines contenant seulement 25 doses hémolytiques (D. H.) par centimètre cube aussitôt après la préparation (toxines 3, 4, 8 et 9 du tableau I), ni celui des 2 toxines franchement plus hémolytiques qui ont été examinées à l'état frais (toxines 5 et 12 du même tableau).

b) *Les cultures centrifugées après cinq jours d'étuve à 37° ne sont pas hémolytiques*. Même à la dose de 1 cm³, elles ne lysent pas les globules rouges de mouton. La cystéine ne les fait pas devenir hémolytiques.

II. PROPRIÉTÉS HÉMOLYTIQUES DE LA TOXINE SORDELLII PRÉPARÉE DEPUIS UN CERTAIN TEMPS. — Nos différentes préparations de toxine *sordellii* sont toujours réparties dans des tubes bouchés au coton ; presque tous les tubes sont conservés dans un frigidaire à 2° et quelques-uns dans une étuve à 37° pour étudier à différentes températures la vitesse d'atténuation de l'hémolysine *sordellii*. A des délais variables, les toxines sont titrées en présence de phosphates pH 6,5.

TABLEAU I. — Activité de la toxine *sordellii* fraîchement préparée, dans différentes conditions, avec les souches 82, 79 et 1.

CULTURE DE <i>Cl. sordellii</i>		ACTIVITÉ DE LA TOXINE OBTENUE				
des préparations	Le bouillon V ¹ ensemencé est additionné de :	Température de l'éluve en degrés	Néput à l'éluve	Nombre de doses mortelles en cm ³	dose hémolytique (en cm ³)	
					en l'absence de cystéine	en présence de 1 p. 1 000 de cystéine
<i>Préparations faites avec la souche 82 :</i>						
1.	2 p. 1.000 de glucose.	37	16 heures.	500 à 1.000	0.01	
2.	2 p. 1.000 de glucose.	31	16 heures.		0.007	
3.	4 p. 1.000 de glucose.	37	16 heures.	500 à 1.000	0.04	0.04
4.	4 p. 1.000 de glucose.	31	16 heures.		0.04	
5.	1 p. 1.000 de glucose et 5 p. 1.000 de peptone 5 B.	31	16 heures		0.003	0.003
6.	1 p. 1.000 de glucose et 5 p. 1.000 de peptone 5 B.	37	16 heures.	5.000 à 10.000	0.007	
7.	1 p. 1.000 de glucose et 5 p. 1.000 de peptone 5 B.	37	5 jours.	10.000	Pas d'hémolyse.	Pas d'hémolyse.
<i>Préparations faites avec la souche 79 :</i>						
8.	1 p. 1.000 de glucose.	37	16 heures		0.04	0.04
9.	4 p. 1.000 de glucose.	31	16 heures		0.04	0.04
<i>Préparations faites avec la souche 1 :</i>						
10.	1 p. 1.000 de glucose.	37	16 heures.	20.000	0.045	
11.	4 p. 1.000 de glucose.	31	16 heures.		0.009	
12.	1 p. 1.000 de glucose et 5 p. 1.000 de peptone 5 B.	31	16 heures		0.004	0.004
13.	4 p. 1.000 de glucose et 5 p. 1.000 de peptone 5 B.	37	16 heures.	10.000	0.02	
14.	4 p. 1.000 de glucose et 5 p. 1.000 de peptone 5 B.	37	5 jours.	20.000	Pas d'hémolyse.	Pas d'hémolyse.
15.	1 p. 1.000 de glucose et 2 p. 1.000 de sang desséché.	37	16 heures.		0.4	
16.	4 p. 1.000 de glucose et 2 p. 1.000 de sang desséché.	31	16 heures.		0.003	

a) TOXINES CONSERVÉES A 2°.

α) 4 toxines sont titrées après un jour de conservation à la température de 2° (toxines 2, 4, 8 et 11 du tableau II). D'après les titrages, 2 toxines ne changent pas de titre en vingt-quatre heures à 2° ; 2 perdent respectivement pendant ce temps 55 et 80 p. 100 de leur pouvoir hémolytique.

En recherchant l'influence de 1 p. 1.000 de chlorhydrate de cystéine sur ces 4 toxines, on constate que la cystéine ne modifie pas l'activité de 3 d'entre elles, alors qu'elle augmente nettement l'effet hémolytique de la dernière : dans ce cas, l'activation est totale (toxine 11, tableau II) ; en effet, la dose minima hémolytique de cette toxine, après un jour de conservation à 2°, est de : 0,02 cm³. En présence de 1 p. 1.000 de cystéine (1 mg. de chlorhydrate par centimètre cube de toxine), la D. H. de la toxine

TABLEAU II. — Influence de la cystéine sur l'activité hémolytique de la toxine *sordelli* conservée à la température de 2° pendant un certain temps.

NUMÉRO de la préparation	DOSE hémolytique de la toxine frûchement préparée (en cm ³)	AGE de la toxine atténuée (conservation à 2°) (en jours)	DOSE HÉMOLYTIQUE en cm ³ , de la toxine atténuée.		
			Titrage en l'absence de cystéine	Titrage en présence de	
				1 p. 1.000 de cystéine	4 p. 1.000 de cystéine
<i>Toxine préparée avec la souche 82 :</i>					
2 }	0,007	1	0,04	0,04	
		9	0,3		0,02
		40	0,3		0,02
3 }	0,04	5	0,3		0,06
		12	> 1		0,06
4 }	0,04	1	0,04	0,04	
		3	0,6	0,06	0,05
		12	> 1		0,05
<i>Toxine préparée avec la souche 79 :</i>					
8 }	0,04	1	0,04	0,04	
		5	0,3		0,04
9	0,04	5	0,8	0,05	0,05
<i>Toxine préparée avec la souche 1 :</i>					
10	0,015	4	0,3	0,02	0,015
11 }	0,008	1	0,02	0,007	
		4	0,3	0,01	0,01

devient égale à $0,007 \text{ cm}^3$. Or, la D. H. initiale de la toxine (déterminée aussitôt après la centrifugation de la culture) n'était que de $0,009 \text{ cm}^3$; ceci montre que la toxine considérée contenait déjà aussitôt après sa préparation un peu d'hémolysine oxydée, activable par la cystéine.

β) *En quatre et cinq jours de conservation à la température de 2°* , les toxines perdent 88 à 98 p. 100 de leur activité hémolytique.

1° *Toxines de la souche 1.* — La cystéine, ajoutée à la dose de 1 p. 1.000 à des toxines âgées de quatre jours, fait presque entièrement reparaitre l'activité hémolytique initiale (préparations 10 et 11 du tableau II); à la dose de 4 p. 1.000, elle manifeste dans un cas un effet activateur légèrement supérieur à celui qu'elle exerce à la dose de 1 p. 1.000 (naturellement nous avons vérifié que le chlorhydrate de cystéine, aux doses employées, n'est pas hémolytique dans nos conditions expérimentales).

2° *Toxines de la souche 79.* — Une toxine âgée de cinq jours récupère sous l'influence de 1 p. 1.000 et 4 p. 1.000 de cystéine 80 p. 100 de son activité initiale. La cystéine, à la dose de 4 p. 1.000, rétablit le titre initial d'une autre préparation, également âgée de cinq jours (toxine 8 du tableau II). La toxine 8 âgée de trente jours n'est pas hémolytique en l'absence de cystéine; la cystéine restaure 80 p. 100 de son activité primitive.

3° *Toxines de la souche 82.* — Deux toxines âgées de cinq jours sont additionnées de 4 p. 1.000 de cystéine; elles récupèrent respectivement 65 et 80 p. 100 de leur activité hémolytique primitive (préparations 3 et 4 du tableau II). Ces deux toxines sont titrées douze jours après leur préparation; en l'absence de cystéine, elles sont à peine hémolytiques: en effet, à la dose de 1 cm^3 , elles sont incapables de lyser tous les globules présents dans $0,1 \text{ cm}^3$ d'une suspension à 5 p. 100 d'hématies de mouton; mais, en présence de cystéine, elles sont notablement hémotoxiques: la cystéine rétablit encore 65 et 80 p. 100 de leur activité initiale.

Une autre toxine est examinée le neuvième et le quarantième jour après la centrifugation (préparation 2 du tableau II). Que la toxine soit âgée de neuf jours ou de quarante jours, sa dose minima hémolytique est de $0,3 \text{ cm}^3$ en l'absence de cystéine; la cystéine augmente son activité: mais l'activation est très incomplète puisque ce réducteur ne fait apparaitre que 35 p. 100 de l'activité que possédait la toxine fraîchement préparée.

En résumé, l'activité hémolytique des toxines préparées avec 3 souches de *Cl. sordellii* diminue rapidement à la température de 2° ; la cystéine, ajoutée à des préparations ayant perdu en quelques jours plus de 80 p. 100 de leur action hémolytique, augmente nettement leur activité et assez souvent même rétablit totalement ou presque totalement leur titre hémolytique initial.

b) TOXINES CONSERVÉES A 37°.

Nous avons signalé que l'activité hémolytique de la toxine *perfringens* filtrée sur bougie *disparatt* en vingt à trente jours à la température de 37° et que différentes préparations de toxine *perfringens* maintenues pendant si longtemps à 37° récupèrent généralement en présence de cystéine leur activité hémolytique du début ; mais après quarante-cinq à soixante jours de conservation à 37°, la toxine *perfringens* s'altère puisqu'elle n'est alors que partiellement activée par la cystéine [5].

Quant à l'hémolysine oxydable de la toxine histolytique, elle perd très vite ses propriétés à 37° : en effet, l'une de nos préparations a perdu 85 p. 100 de son activité en quinze heures et la cystéine n'a eu aucun effet sur elle. Après six jours à 37°, la toxine ne possédait que 1,5 p. 100 de l'activité initiale ; la cystéine n'augmentait pas son titre.

Souvent nous avons constaté que l'hémolysine non oxydable de la toxine vibron septique est détruite en vingt-quatre heures à 37° [6].

La filtration sur bougie L 2 diminue peu l'activité hémolytique de la toxine *sordellii*. En recherchant la vitesse d'atténuation de la toxine *sordellii* filtrée, riche en hémolysine, on observe d'abord qu'un séjour de vingt heures à 37° suffit pour supprimer les propriétés hémolytiques de cette toxine et on constate ensuite que la cystéine ne confère pas la moindre efficacité à cette toxine inactivée. L'hémolysine oxydable de *Cl. sordellii* se range donc dans le groupe des hémolysines très instables à 37°.

III. ACTION DE DIFFÉRENTS SÉRUMS SUR LES TOXINES *sordellii*, *perfringens* θ , BOTULINIQUE C ET HISTOLYTIQUE. — Après avoir évalué l'activité hémolytique de différentes préparations de toxine *sordellii*, nous avons fait agir divers sérums sur quelques-unes de ces préparations. Pour étendre la portée de nos résultats, nous avons déterminé l'activité anti-hémolytique que ces sérums exercent sur d'autres hémolysines oxydables : θ , histolysine et botulinolysine.

Dose d'épreuve de toxine.

L'activité anti-hémolytique des sérums est déterminée vis-à-vis de : 17 D. H. de toxine *sordellii* préparée avec la souche 1 ; 15 D. H. de toxine *sordellii* élaborée par les souches 79 et 82 ; 15 D. H. de toxine botulinique C préparée avec la souche CN 2749 ; 20 D. H. d'une toxine histolytique précipitée par le sulfate d'ammonium ; vis-à-vis de la dose LH/10 d'une toxine *perfringens* précipitée riche en hémolysine θ : cette dose d'épreuve de toxine représente 65 D. H. Nous exprimons le titre anti- θ des sérums anti-*perfringens* en unités internationales.

Nous avons employé au cours des dosages : de l'eau physiologique tamponnée à pH 6,5 par des phosphates lorsque les sérums ont été titrés vis-à-vis des toxines *sordellii* ; de l'eau physiologique ordinaire dans les titrages en présence de toxine *perfringens* θ .

Pour évaluer l'activité hémolytique de la toxine histolytique et le pouvoir anti-hémolytique que les sérums exercent sur l'histolysine, nous avons utilisé une toxine dissoute dans du bouillon VI additionné de cystéine ; toutes les dilutions ont été ensuite préparées avec de l'eau physiologique ordinaire ajustée à pH 6,9.

RÉSULTATS.

a) L'effet hémolytique de la toxine *sordellii* fraîchement préparée n'est pas empêché par de faibles quantités d'antitoxine *perfringens* α . Cette observation est faite en utilisant un sérum anti-*perfringens* de type A titrant 20 unités anti- α par centimètre cube et ne contenant que des traces insignifiantes d'anti-hémolysine θ . Ce sérum, à la dose de 0,1 cm³, n'inhibe pas 15 D. H. de la toxine préparée avec la souche 82. A la dose de 0,05 cm³, il n'inhibe pas 15 D. H. des toxines faites avec les souches 79 et 1 ; il est seulement actif à la dose de 0,1 cm³ sur les toxines de ces deux souches.

b) L'hémolysine oxydable de la toxine *sordellii* préparée avec les souches 1, 79 et 82 est non seulement neutralisée par le sérum anti-*sordellii* mais encore par des traces de sérum anti-*perfringens* A riche en anti-hémolysine θ ainsi que par des traces de sérums anti-tétaniques et anti-histolytiques. En effet : 15 D. H. de la toxine faite avec la souche 82 sont neutralisées par 1/50.000 cm³ du sérum anti-*perfringens* 716, par 1/35.000 cm³ du sérum anti-tétanique 1463 et par 1/20.000 cm³ du sérum anti-histolytique 391 (tableau III).

Ainsi, l'hémolysine *sordellii*, tout comme l'hémolysine *perfringens* θ , la tétanolysine et l'histolysine, est neutralisée par l'un quelconque des sérums suivants : anti-*perfringens* θ , anti-tétanique et anti-histolytique.

Divers caractères distinguent certaines des hémolysines précédemment énumérées. Lorsqu'on titre ces hémolysines après conservation à la température de 2° on constate que l'histolysine oxydée conserve moins longtemps que l'hémolysine θ oxydée la propriété d'être activable par la cystéine ; ainsi, la toxine histolytique après être restée pendant sept jours à 2° est encore fortement activable par la cystéine ; mais lorsqu'elle est âgée de trois mois, la cystéine ou l'hydrosulfite de soude ne l'activent que légèrement [5]. Par contre, différentes de nos préparations de toxine *perfringens* recouvrent, en présence de cystéine, leur très forte activité hémolytique primitive, même après dix mois de conservation à 2°.

c) Le sérum anti-*sordellii* neutralise non seulement l'hémolysine oxydable de la toxine *sordellii* mais encore, ainsi que l'on pouvait s'y attendre, différentes hémolysines hétérologues oxydables. Celui que nous avons employé à pu, à la dose de 1/2.000 cm³,

TABLEAU III. — Activité de divers sérums vis-à-vis de différentes toxines microbiennes.

IMMUNOSÉRUM			POUVOIR ANTI-HÉMOLYTIQUE VIS-A-VIS DES TOXINES :						
Nature	Numéro	Récolté le	Titre anti- <i>perfringens</i> α (U. I.)	<i>perfringens</i> θ	(souche 1) <i>sordellii</i>	(souche 79) <i>sordellii</i>	(souche 82) <i>sordellii</i>	histolytique (souche Lévi)	<i>botulinum</i> C (souche C. N. 2749)
Anti- <i>sordellii</i>			0,5 à 1	200	6.000	4 000	5.000	2.500	4'0
Anti- <i>perfringens</i> . . .	GGP 37		20	Insignifiant.	10 à 20	10 à 20	< 10	10	> 5
Anti- <i>perfringens</i> . . .	135		55	20 U. I.	30.000	50 000	2.500 à 5.000	5.000	
Anti- <i>perfringens</i> . . .	716	16 sept. 1.949	175	1.800 U. I.	25.000	25.000	50 000	25 000	10 000
Anti-histolytique . . .	447	29 oct. 1.948	> 1	2 000	15.000		> 10 000	40 000	
Anti-histolytique . . .	391	14 oct. 1.949	> 1	200			20.000		
Anti-tétanique	1.463	14 sept. 1.947	> 1	1.400			35 000	10 000	
Dose d'épreuve de toxine hémolytique					47 D. H.	45 D. H.	45 D. H.	20 D. H.	15 D. H.

U. I., unités internationales ; D. H., doses hémolytiques.

U. I., unités internationales ; D. H., doses hémolytiques.

neutraliser 65 D. H. de la toxine *perfringens* 0; à la dose de 1/2.500 cm³, il a neutralisé 20 D. H. de toxine histolytique et, à la dose de 1/400 cm³, 15 D. H. de toxine botulinique C (tableau III). De ces résultats on peut déduire, croyons-nous, que l'animal producteur de ce sérum anti-*sordellii* est immunisé avec un antigène contenant, aussitôt après la préparation, de l'hémolysine *sordellii* oxydable.

Nous avons indiqué, au début de notre exposé, que divers auteurs tendent à considérer *Cl. sordellii* comme une variété de *Cl. bifermentans*. Il serait intéressant d'étudier, à différentes températures, la vitesse d'atténuation des cultures inégalement hémolytiques préparées avec diverses souches de *Cl. bifermentans*. Etant donné qu'un sérum anti-*perfringens* non concentré peut, à dose très faible, inhiber les propriétés hémolytiques des cultures *bifermentans* dans les expériences signalées par A.-R. Prévot et M. Capponi (3), il est indubitable à notre avis que les cultures *bifermentans* très hémolytiques contiennent une hémolysine oxydable; cette hémolysine doit être neutralisée aussi par le sérum anti-*sordellii* et les réducteurs doivent augmenter l'activité hémolytique des filtrats *bifermentans* atténués après conservation à 2°.

IV. NOCIVITÉ *in vivo* DE LA TOXINE *sordellii*. — En ensemençant les souches 1 et 82 de *Cl. sordellii* dans divers bouillons Vf additionnés de glucose et parfois de peptone commerciale, on peut rapidement préparer une toxine de titre élevé.

Ainsi, un bouillon Vf glucosé à 1 p. 1.000,ensemencé avec la souche 1, nous a permis d'obtenir en vingt-deux heures à 37° une toxine qui contenait 10.000 à 20.000 doses mortelles par centimètre cube d'après les titrages sur souris par voie veineuse. Cette préparation a été faite en septembre 1946. Trois ans plus tard, en ensemençant cette souche dans un autre bouillon Vf glucosé à 1 p. 1.000, nous avons obtenu en seize heures à 37° une toxine qui tuait à la dose de 1/20.000 cm³ des souris de 17 à 20 g. injectées dans les veines (préparation 10 du tableau I). Cette toxine est hémolytique.

Dans un autre essai, nous avons ensemencé avec la souche 1 un bouillon Vf additionné de 1 p. 1.000 de glucose et de 1 p. 1.000 de peptone 5 B : la toxine *hémolytique* obtenue en seize heures à 37° a tué les souris à la dose de 1/10.000 cm³; la toxine obtenue en cinq jours à 37° a été nocive pour la souris à la dose de 1/20.000 cm³ mais sans effet sur les hématies de mouton (préparations 13 et 14 du tableau I).

La toxine hémolytique 6 du tableau I, préparée en seize heures à 37° avec la souche 82, contient 5.000 à 10.000 doses mortelles par centimètre cube. La toxine 7 que nous avons préparée dans

(3) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 octobre 1949.

les mêmes conditions — mais en cinq jours — titre 10.000 doses mortelles par centimètre cube : elle n'est pas hémolytique.

Ces divers résultats montrent que l'antigène léthal de la toxine *sordellii* est stable dans les cultures à 37° alors que l'antigène hémolytique est extrêmement labile.

Nos préparations de toxine *sordellii* sont très nocives en injections sous-cutanée et intradermique : ainsi une préparation qui provoque la mort des souris à la dose de 1/8.000 cm³ d'après les titrages par voie veineuse, est capable à la dose de 1/5.000 cm³ de tuer les souris inoculées sous la peau. Une toxine précipitée par le sulfate d'ammonium en mars 1935 produit actuellement, à la dose de 0,0005 mg., une forte nécrose lorsqu'elle est injectée dans le derme des cobayes ; cette toxine précipitée présente les caractéristiques suivantes : dose minima mortelle = 0,002 mg. (souris, veines). Dose minima hémolytique : 2 mg. en l'absence de cystéine et 0,4 mg. en présence de cystéine. Dose minima lécithinasique : 2 mg. en présence de 0,2 cm³ de sérum humain et 0,02 mg. en présence de 0,2 cm³ d'une solution de jaune d'œuf.

RÉSUMÉ.

1° Différentes souches de *Cl. botulinum* type C élaborent une hémolysine oxydable. Cette hémolysine s'atténue très vite à la température de 2° ; elle est neutralisée par l'anti-hémolysine *perfringens* θ, par les sérums anti-tétaniques et anti-histolytiques.

2° *Cl. sordellii* engendre rapidement à 37° dans le bouillon Vf glucosé des quantités très appréciables d'hémolysine oxydable.

3° A la température de 2°, le pouvoir hémolytique des toxines préparées avec 3 souches de *Cl. sordellii* diminue de 88 à 98 p. 100 en quatre à cinq jours ; la cystéine augmente l'activité des toxines atténuées.

A la température de 37°, la toxine *sordellii* perd en peu de temps ses propriétés hémolytiques. La cystéine ne rétablit pas l'activité d'une toxine devenue inactive au cours d'un séjour de vingt heures à 37°.

4° L'hémolysine oxydable de *Cl. sordellii* est inhibée par l'anti-hémolysine *perfringens* θ, par les sérums anti-histolytiques et anti-tétaniques, c'est-à-dire par l'immunsérum des animaux préparés contre des hémolysines oxydables.

5° Très rapidement, à la température de 37°, *Cl. sordellii* sécrète dans le bouillon Vf glucosé une toxine extrêmement nocive en injections intraveineuse, sous-cutanée ou intradermique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MILES (E. M.) et MILES (A. A.). *J. gen. Microbiol.*, 1947, **1**, 385-399.
- [2] HAYWARD (N. J.). *J. Path. a. Bact.*, 1948, **55**, 285.
- [3] MACFARLANE (M. G.). *Biochem. J.*, 1949, **42**, 590-595.
- [4] GUILLAUMIE (M.), KRÉGUER (A.) et FABRE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 911.
- [5] GUILLAUMIE (M.). *Ces Annales*, 1941, **66**, 329 ; 1942, **68**, 84.
- [6] GUILLAUMIE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 140.

RECHERCHES ÉPIDÉMIOLOGIQUES SUR L'ÉPIDÉMIE D'ENCÉPHALITE SURVENUE DANS LE PALATINAT DE 1947 A 1949

par R.-E. BADER et R. HENGEL.

(Institut d'Hygiène de l'Université de Heidelberg.)

I

On a rarement eu l'occasion, au cours des dernières décades, d'observer de grandes épidémies, d'étiologie inconnue, se prêtant à une étude analytique détaillée. Les perfectionnements des méthodes bactériologiques, en particulier la classification en types, l'étude des virus et de l'immunologie permettent de découvrir l'étiologie de la plupart des maladies infectieuses, et, grâce à l'expérimentation, les caractéristiques propres à l'épidémie. Mais si, du fait de circonstances défavorables ou de l'impossibilité de la mise en évidence microscopique, de la culture ou de l'expérimentation sur l'animal, l'agent de la maladie et ses propriétés demeurent inconnus, l'épidémiologie analytique, avec sa classification des maladies, reste le seul moyen d'obtenir des renseignements sur sa nature et ses lois, sur les réservoirs de virus humains ou animaux et sur le mode de transmission. L'analyse épidémiologique comprend l'étude de la géomorphologie, de la flore, de la faune et du climat de la contrée atteinte, de l'évolution dans le temps de l'épidémie et enfin des circonstances de la vie des malades et des rapports que ceux-ci ont entre eux. Le cas le plus simple, en raison de l'enchaînement des causes qui peut souvent être reconstitué sans lacunes, est celui des maladies transmises par les arthropodes. Déjà plus difficile, en raison de la multiplicité des possibilités d'infection, est le cas des maladies se propageant par gouttelettes, par les pous-sières, par les aliments, ou par contact ; cependant, dans ces cas, la culture de l'agent sur des milieux vivants ou non vivants permet souvent d'expliquer leur épidémiologie. Mais ce n'est plus le cas pour une série de maladies, comme par exemple l'hépatite épidémique, dont l'agent est incontestablement un virus, mais cependant n'a jamais été vu ni cultivé et n'a permis aucune expé-rimentation sur l'animal. La possibilité d'étudier une maladie sur

des volontaires n'existe que pour les infections sans danger ; mais même quand la transmission est ainsi possible, les conclusions qu'on en tire quant à la transmission naturelle ne sont valables que si elles sont confirmées par les résultats de l'analyse épidémiologique.

L'encéphalite de Saint-Louis est un bon exemple des services que peut rendre l'analyse épidémiologique en orientant, dans une direction déterminée, l'expérimentation qui permettra finalement d'expliquer l'évolution naturelle de la maladie. Les observations épidémiologiques (et en particulier les rapports de la maladie avec les cours d'eau et son existence à la campagne et à la périphérie des villes) avaient montré que des insectes devaient être inclus dans le cycle de la maladie. Effectivement, on a réussi la transmission de l'affection de souris à souris avec les espèces de moustiques *Culex*, *Aedes* et *Theobaldia*. Quand, à la suite de ces résultats épidémiologiques, on rechercha le virus chez les moustiques dans la nature, on le trouva chez *Culex tarsalis* et *Culex pipiens* (Hammon et Reeves).

II

Nos recherches épidémiologiques sur l'encéphalite survenant fréquemment depuis septembre 1947 dans la région de Spire (et nommée par la population « nouvelle maladie », « maladie des Français » ou « maladie des Marocains ») ont commencé pendant l'hiver 1948-1949. C'est le Dr Staudacher qui a attiré notre attention sur cette épidémie. En tout, 53 malades ont été examinés par nous personnellement et l'anamnèse épidémiologique enregistrée d'après un schéma établi dès le début de l'enquête mais constamment élargi au fur et à mesure des recherches. Des renseignements concernant deux autres malades nous ont été donnés par écrit. En outre, les médecins de la région, que nous sommes heureux de remercier ici, nous ont apporté une aide efficace.

Le domaine de la maladie s'étend (fig. 1), sur la rive gauche du Rhin, sur une longueur d'environ 50 km. et une largeur d'environ 20 km., de Ludwigshafen au nord jusqu'à Neuburg au sud. A l'ouest, la limite n'est pas très nette, puisqu'on nous a signalé des cas dans le Palatinat occidental (par exemple à Eisenberg) que, pour des raisons étrangères à nos recherches, nous avons dû renoncer à examiner. L'agriculture de ces régions, sauf quelques parties marécageuses sur les bords du Rhin, est partout à peu près la même : des champs surtout, peu de prés, à l'ouest des vignes, beaucoup de tabac ; au nord-ouest de Spire et à l'ouest de Germersheim, des forêts. L'agriculture correspond au sous-sol géologique : les parties cultivées en champs sont des terrains constitués par du loess et de l'argile de caractère dilu-

vien ; les régions de forêts correspondent à des sols diluviens de sable, de galets et de graviers ; dans les vallées qui aboutissent à celle du Rhin on trouve surtout des prairies, plus rarement des parties marécageuses dont le sol est constitué par des sédiments alluviaux. A l'est, l'épidémie s'est d'abord arrêtée au Rhin, qui jusqu'à juillet 1948 constitua une barrière natu-

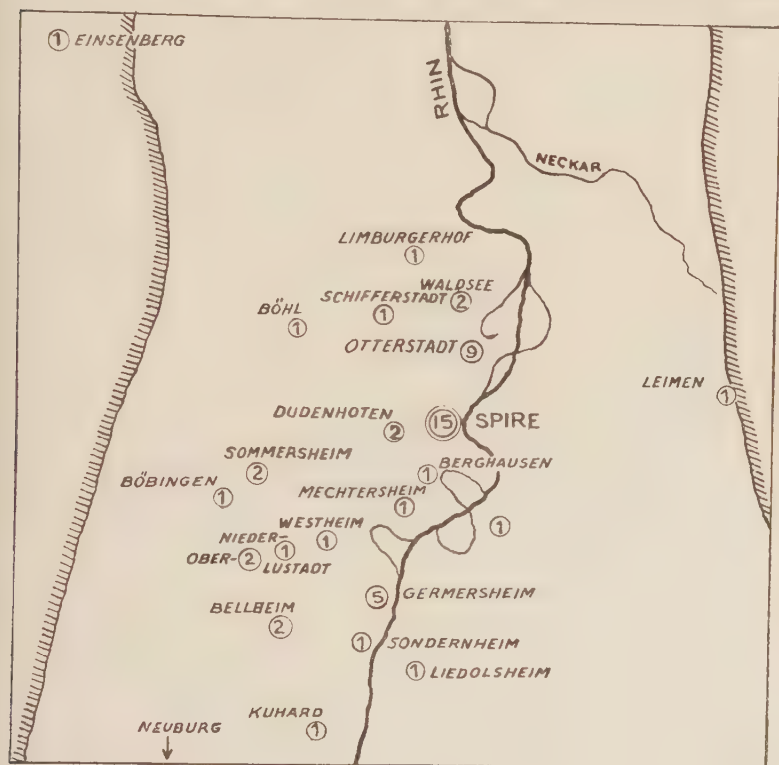


Fig. 1. — Localités atteintes par la maladie.

relle ; ce n'est qu'à partir d'octobre 1948 que des cas commencèrent à apparaître sur les territoires de la rive droite ; leur rapport avec l'épidémie du Palatinat est vraisemblable, puisqu'il y eut un cas à Oberhausen, village qui est relié à Spire par un important bac à autos, et un autre à Liedolsheim, également en relation par bac à autos avec Gernersheim. Ces bacs, seuls en service sur tout le cours du Rhin entre Ludwigshafen et Gernersheim, furent très employés, du fait de l'absence des ponts, lorsque le passeport entre les zones fut aboli. Enfin on observa encore sur la rive droite du Rhin un cas dans chacune

des localités suivantes : Tiefenbronn près de Pforzheim, Hemsbach a. d. Bergstrasse, Waldmichelbach, Bürstadt et Leimen.

Les centres de gravité de l'épidémie sur la rive gauche du Rhin se trouvent à Spire (30.000 habitants, 15 malades), à Otterstadt au nord de Spire (1.800 habitants, 9 malades), et au sud à Germersheim (4.400 habitants, 5 malades). Il restera encore à discuter la question de savoir si la situation de ces villes, à proximité immédiate du Rhin et de son bras droit en partie marécageux, le « Vieux Rhin », peut être invoquée dans l'épidémiologie de l'encéphalite. Dans 6 des plus petits villages (Waldsee, Rülzheim, Dudenhofen, Bellheim, Gommersheim, Oberlustadt), il

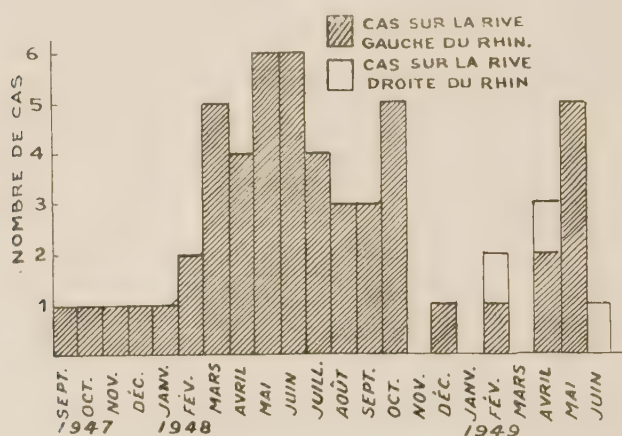


FIG. 2. — Évolution de l'épidémie.

y eut chaque fois 2 malades, et dans 11 autres (Böbingen, Mechtersheim, Böhl, Niederlustadt, Westheim, Limburgerhof, Kuhard, Sondernheim, Schifferstadt, Neuburg, Berghausen), 1 malade. Ces villages n'étaient pas situés sur les routes comportant beaucoup de circulation. La nature de l'agriculture dans ces régions ne semble pas non plus avoir de rapport avec la maladie.

Les 55 cas d'encéphalite étudiés jusqu'ici s'étendent sur une période de vingt-deux mois. Comme le montre la figure 2, l'épidémie commença en septembre 1947. Dans les six mois d'automne et d'hiver, jusqu'à février 1948, 7 personnes seulement en furent atteintes. Cependant, dans le mois suivant, mars 1948, le nombre des malades s'éleva à 5, pour se maintenir à 4-6 par mois jusqu'en octobre 1948. En tout, pendant les mois chauds, 36 personnes tombèrent malades. Pendant l'hiver 1948-1949 comme pendant l'hiver 1947-1948, il n'y eut que 3 nouveaux malades en cinq mois. Bien que, dans l'année 1948, il y eut ainsi 4 cas dans

les mois froids (janvier, février, novembre, décembre) et 36 dans les mois chauds (mars à octobre), il serait prématuré de conclure, d'après la courbe d'une seule année, à un rythme saisonnier ; cette conclusion ne peut être tirée que d'observations portant sur plusieurs années. La courbe de la maladie dans les mois de mars et avril 1949, au cours desquels le développement de l'encéphalite était attendu avec anxiété, sembla d'abord en contra-

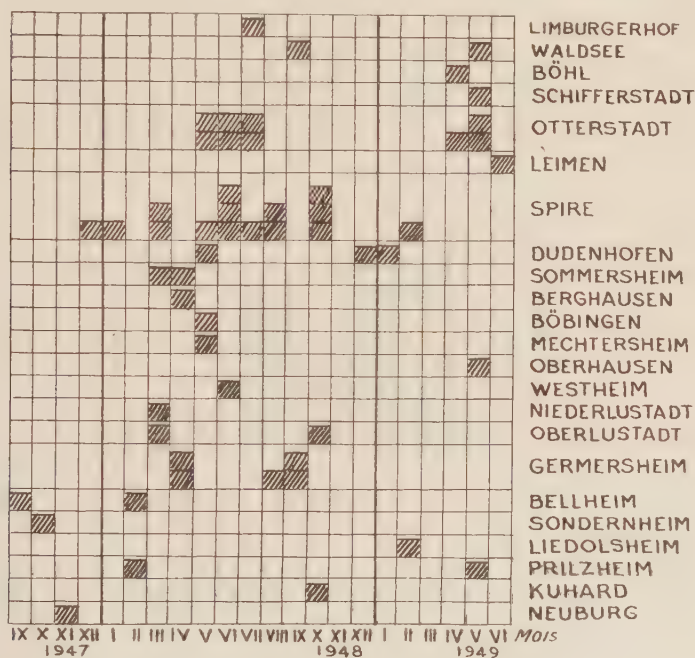


FIG. 3. — Extension de l'épidémie.

diction avec un rythme saisonnier annuel de la maladie ; on fut donc d'autant plus surpris quand, d'avril à juin 1949, 9 nouveaux cas furent signalés. Seule l'évolution future de la courbe pourra permettre de résoudre la question de savoir si le clocher de printemps-été-automne 1948 traduit un rapport immédiat avec la saison chaude, ou bien s'il s'est agi d'une coïncidence fortuite. Nous voudrions cependant, en raison de l'augmentation de la morbidité au printemps 1949, admettre un rythme saisonnier comme hypothèse de travail.

L'examen combiné de la répartition régionale des cas isolés et de l'évolution dans le temps de l'épidémie (fig. 3) prouve l'apparition sporadique de cas d'encéphalite dans le temps et

dans l'espace. Il est vrai que, dans l'hiver 1947-1948, la maladie était encore cantonnée à la région sud de Spire et limitée à cette seule ville ; mais déjà en mai, on observe un premier malade au nord, à Otterstadt. A partir de ce moment, la répartition des cas ne suit évidemment pas de règle ; la maladie ne s'est nullement répandue du sud vers le nord, on a bien plutôt l'impression d'une extension en « goutte de pluie », surtout si l'on ne considère que les premiers cas survenant à un endroit donné.

Tous les âges sont atteints, de sept à soixante-sept ans, les femmes un peu plus souvent que les hommes (34 femmes, 21 hommes); encore cette différence porte-t-elle sur un bien petit nombre de sujets. La répartition que donne la figure 4 ne correspond peut-être pas absolument à la réalité, car les tout jeunes

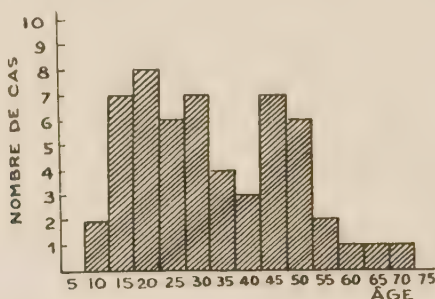


FIG. 4. — Répartition des cas suivant l'âge.

enfants sont trop faiblement représentés ; dans quelle mesure ceci est-il dû véritablement à leur petit nombre ? C'est ce qu'on ne saurait encore dire. Aucun malade ne pouvait se rappeler une atteinte précédente d'encéphalite. Contrairement à l'opinion de la population, ceci n'est nullement une preuve que la maladie aurait été apportée par les troupes d'occupation : la plupart des cas ont apparu à des endroits et à des moments où ces troupes n'étaient pas présentes. La maladie d'un jeune officier français après des manœuvres montre cependant que les conditions dans lesquelles vivaient les troupes d'occupation ne les protégeaient pas.

Une accumulation de cas ne s'est rencontrée que deux fois : dans une rue d'Otterstadt (8 cas) et dans des bâtiments de la maison mère des Diaconesses de Spire, située à la limite de la ville (6 cas). Dans un jardin d'enfants dépendant de la maison mère, 2 sœurs tombèrent malades le même jour ; dans un centre de jeunesse, 3 pensionnaires en six mois, et 1 diaconesse du personnel administratif. En dehors de cela, il n'y eut jamais plus d'un malade par famille et par maison ; tous les autres membres

de la famille et toutes les personnes vivant dans la maison — en tout 130 adultes et 47 enfants — restèrent indemnes. Dans les localités citées plus haut où il y eut plusieurs cas, ceux-ci se succédèrent le plus souvent à de longs intervalles.

La majorité de nos malades (40) n'avaient eu aucun rapport

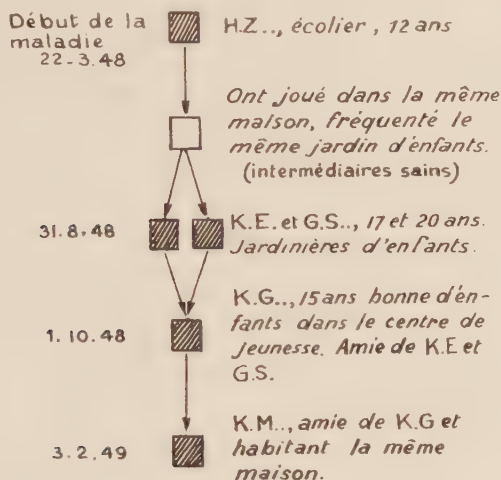


FIG. 5 — Groupe des malades de Spire.

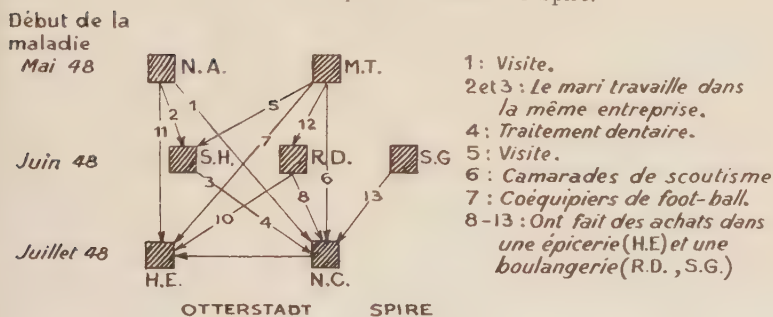


FIG. 6. — Groupe des malades d'Otterstadt.

direct ou indirect avec d'autres malades. A Spire, les malades du Centre de Jeunesse et du jardin d'enfants, et, à Otterstadt, une partie des habitants malades de la rue ci-dessus mentionnée se connaissaient et étaient en relations amicales ou professionnelles plus ou moins étroites. Les figures 5 et 6 montrent schématiquement les rapports et les possibilités d'infection dont les problèmes (très souvent incubation de très longue durée, porteurs sains, etc.) seront discutés plus loin.

L'existence d'autres maladies infectieuses avant l'apparition de l'épidémie a toujours été niée, en particulier celle de la grippe qui, dans l'hiver 1948-1949, était très répandue. Les quelques malaises, refroidissements ou surmenage signalés par certains malades au moment où commença leur encéphalite doivent être considérés comme fortuits en raison de leur peu de fréquence. Il est donc improbable qu'un agent infectieux ait préparé la voie à l'encéphalite.

La situation des maisons habitées par les malades dans les localités atteintes est caractéristique. Dès le début de l'épidémie, on remarquera que la plupart des malades habitaient près de la périphérie et que leur maison était immédiatement voisine des champs ou n'était séparée que par le jardin. Ceci vaut aussi bien pour les villes de Spire et de Gernersheim que, jusqu'à un certain point, pour celle d'Otterstadt. Sur 53 malades, 30 habitaient à la périphérie, 11 à environ 50 ou 100 mètres de la périphérie, et 12 seulement dans une partie plus centrale de la ville. Parmi les localités rurales, 2 seulement avaient le caractère d'un village à rues. Dans le vieux Spire, situé au centre de la ville, seul tomba malade le pensionnaire d'un internat qui, selon toute vraisemblance, avait contracté son infection pendant un séjour de vacances chez ses parents à Waldsee, au nord de Spire. A ce propos, il faut signaler que, sur les 55 malades, 27 étaient des agriculteurs ou vivaient à la campagne. 3 malades seulement n'avaient pas de profession rurale ni aucun contact avec la campagne. Le degré de propreté des habitations et de leurs habitants était très variable; cependant, la plupart des maisons étaient propres et bien entretenues. 26 maisons méritaient la note très bien, 19 bien, 3 médiocre, 5 mal.

40 malades avaient des animaux domestiques (poules, lapins, cochons, chèvres, chiens, chats, plus rarement bovidés et chevaux) : les maladies de ces animaux n'étaient pas plus fréquentes que d'habitude. La présence de rats et de souris fut constatée dans 22 maisons. On ne put observer une multiplication anormale de souris des champs ou autres rongeurs sauvages (recherches effectuées par le Landwirtschaftsrat Mayer). A Gernersheim seulement, on nous signala une abondance anormale de souris.

La recherche des parasites, punaises, poux, puces et tiques, fut, en général, négative. Cependant, un malade de quinze ans, mort en juin 1949 au stade aigu, avait trouvé sur son coude gauche une tique gorgée de sang, dont les pièces buccales étaient arrachées et que nous avons pu voir ; il l'avait attrapée cinq jours auparavant, au cours d'une promenade sur la route de Berg, dans le district de Heidelberg. Les moustiques étaient, comme presque toujours dans la plaine du Rhin, nombreux dans la région de l'épidémie : en dehors du « moustique du Rhin », *Aedes vexans*, nous avons trouvé des *Culex* et des *Theobaldia*.

III

Bien que, en raison de l'étiologie inconnue, on n'ait pu prouver que l'épidémie répondait aux principes de Henle-Koch, il n'y a aucun doute que l'encéphalite observée dans la plaine du Rhin était bien une maladie infectieuse. La question du réservoir de virus et du mode de transmission se pose donc, en même temps que celle de savoir si les faits observés sont conformes à ceux constatés dans d'autres épidémies d'encéphalites connues.

L'épidémiologie générale montre que les réservoirs de virus des épidémies humaines doivent être recherchés soit chez l'homme lui-même, soit dans le règne animal, soit dans l'un et l'autre. Dans le cas le plus simple, forme homogène-homonome (*) de transmission, l'agent infectieux est transmis uniquement d'homme à homme par contact direct ou indirect, par les poussières ou les gouttelettes. C'est à ce mode de transmission que correspondent les observations faites à Spire et à Otterstadt, où l'épidémie s'est développée dans un espace relativement restreint et chez des personnes qui, pour des raisons de famille, d'amitié ou d'affaires, avaient d'étroits rapports entre elles, à condition, cependant, d'admettre que les périodes de latence ou d'incubation fussent très longues, ou bien qu'il existât des porteurs sains. Ceci est particulièrement net en ce qui concerne le groupe des malades de la maison des Diaconesses de Spire, où les intervalles entre les différents cas — en partie à cause de l'existence de porteurs sains — ont été de cinq, un et quatre mois (fig. 3), tandis que, dans le groupe d'Otterstadt, dans lequel 6 cas sont répartis sur trois mois, ces intervalles sont moindres. Mais déjà, à Gernersheim, où il n'existait pas de rapports entre les malades, et encore moins dans les villages où 1 ou 2 sujets au plus étaient malades dans un entourage sain, la possibilité d'une transmission homogène-homonome (*) perd de sa vraisemblance. L'absence d'épidémie de famille ou de maison dans les endroits fortement frappés parle également contre la transmission d'homme à homme ; de même, la faible morbidité dans les mois d'hiver, dans lesquels le contact est spécialement étroit, et l'observation que la propreté des habitations est sans influence sur la morbidité. La transmission homme → homme → homme ne pourrait donc, dans les conditions données, être sérieusement envisagée que si on admettait une infection très répandue dans la population, jointe à un très faible pouvoir pathogène de l'agent virulent et à une disposition particulière des malades. Bien que ces conditions soient en partie celles de la poliomyélite, il ne faut pas oublier que, contrairement à cette maladie, l'encéphalite du Palatinat est une épidémie

(*) Néologisme proposé par l'auteur.

qui apparaît pour la première fois dans une contrée très limitée au point de vue géographique, sans tendance à s'étendre et avec tendance, au contraire, à demeurer solidement attachée à la même région. Il est contraire à nos conceptions épidémiologiques qu'un agent qui, dans un temps très court, se répand d'une façon homogène-homonome demeure aussi étroitement limité géographiquement et, comme le montrent les exemples de Spire et d'Otterstadt, provoque toujours, pendant quinze mois, de nouveaux cas dans un petit groupe de la population. L'existence de porteurs sains est improbable, parce que beaucoup de malades n'avaient pas quitté leur village ni reçu de visites de l'extérieur depuis plusieurs années. Enfin, nous avons déjà expliqué pourquoi il était peu vraisemblable d'admettre que la voie avait été ouverte à l'infection par d'autres circonstances, telles que maladies diverses, refroidissements ou surmenage.

Les mêmes arguments qui parlent contre l'admission de l'homme comme réservoir de virus sont valables contre celle de vecteurs animaux, c'est-à-dire contre une transmission hétérogène-homonome. Dans les maladies qui surviennent exclusivement chez l'homme et sont transmises par les arthropodes (paludisme, fièvre jaune, fièvre de trois jours, dengue), la formation de petits foyers dans la plupart des endroits atteints est caractéristique, ce qui manquait absolument dans notre épidémie. En outre, la période assez considérable s'écoulant entre les divers cas conduit à penser que, dans les épidémies transmises par les insectes, l'existence de porteurs sains est assez difficile à admettre, car l'agent devrait se trouver dans le sang, même en l'absence de symptômes.

L'existence d'une transmission hétéronome, c'est-à-dire l'origine de la maladie à partir d'un réservoir animal, peut, au contraire, être sérieusement envisagée, d'autant plus qu'on sait, d'après l'exemple de l'encéphalite russe, que l'origine d'une encéphalite à virus peut se trouver dans le règne animal. Etant donné que l'épidémie du Palatinat s'est déroulée presque exclusivement dans des régions rurales et qu'une grande partie des malades s'occupaient d'agriculture, un grand nombre d'animaux peuvent être soupçonnés. La plupart des familles atteintes possédaient quelques animaux parmi lesquels, comme nous l'avons déjà dit, des maladies n'apparaissent qu'exceptionnellement (lapins). Dans les exploitations agricoles, les rats et les souris sont inévitables, et nous les avons trouvés dans les maisons dans 22 cas. Au cours des travaux des champs, on a aussi l'occasion de se trouver en contact avec des rongeurs sauvages. L'absence de phénomènes inhabituels dans la faune ne parle pas contre l'existence d'un réservoir animal, car il y a des épizooties qui évoluent en silence et les porteurs de virus sains ne sont pas rares. Une source

d'infection dans le règne animal doit d'autant plus être prise en considération que des cas sporadiques comme il en existe précisément dans notre épidémie, sont un trait caractéristique des maladies qui se répandent d'abord chez les animaux pour envahir l'homme ensuite.

Ceci est particulièrement évident dans la fièvre jaune. Lorsque la maladie est transmise à l'homme sous forme de fièvre jaune de brousse par les *Hemagogus* à partir des animaux sauvages, elle apparaît sporadiquement ; lorsqu'elle est transmise d'homme à homme par les *Aedes ægypti* dans les grandes villes, elle est épidémique.

Quel animal peut être envisagé comme source d'infection et quelles sont les possibilités de transmission si l'on admet un réservoir de virus animal dans notre épidémie ? Une infection par contact, gouttelettes ou poussières, c'est-à-dire une transmission homogène-hétéronome, est peu vraisemblable pour une maladie provenant des animaux domestiques, car le contact avec ces animaux est plus étroit en hiver que dans les mois chauds. Les chances de contracter une maladie de cette façon à partir des animaux sauvages sont très faibles ; on aurait dû justement, dans ce cas, observer (ce qui ne s'est pas produit) une prévalence de la maladie pendant les mois de la moisson. En outre, il faut remarquer qu'une grande partie des malades vivaient bien dans un milieu paysan, mais exerçaient un autre métier, et, par conséquent, ne se livraient pas aux travaux des champs. Une infection due à la viande d'animaux tués ou à des produits d'origine animale quelconque, ou bien à l'eau doit, à notre avis, être exclue, car il manquait précisément dans nos cas ce qui est la caractéristique des infections alimentaires, c'est-à-dire l'atteinte de tous les sujets qui avaient consommé la même nourriture.

Mais si, de ce fait, l'on considère la propagation de l'encéphalite à partir d'un animal par contact direct ou indirect comme impossible, il reste encore la possibilité d'une transmission hétérogène-hétéronome, c'est-à-dire d'une transmission à l'homme à partir d'un réservoir animal par l'intermédiaire d'un arthropode hématophage. Or, l'existence de notre encéphalite presque exclusivement dans les mois chauds de l'année et son apparition sporadique dans un milieu sain, la préférence qu'elle marquait pour les localités au voisinage du Rhin et riches en moustiques comme Germersheim, Spire, Otterstadt et les districts ruraux et, à l'intérieur de ceux-ci, pour les maisons situées à la périphérie, son existence dominante chez les paysans, parlent en faveur de cette possibilité. Dans le même sens serait à interpréter le nombre moindre des atteintes chez les jeunes enfants, moins exposés aux insectes. La maladie mortelle du malade G..., après une morsure de tique, pourrait être considérée comme une confirmation de ce

point de vue. Le grand nombre des cas survenus à la périphérie des localités seraient une preuve de plus qu'on a affaire à un réservoir de virus sauvage, et non domestique.

La question du mode de transmission ne peut actuellement être résolue que par des hypothèses. Il semble improbable que les tiques jouent seules un rôle, comme on pourrait le conclure d'après le cas du malade G..., car de nombreuses personnes qui n'exerçaient pas de métier rural et, par conséquent, n'avaient aucune raison de se trouver en contact avec des tiques, ont été atteintes. Il semble bien plus vraisemblable, d'après les constatations épidémiologiques, que les moustiques soient à incriminer. Les conditions climatiques de la plaine du Rhin entre le Hardt et l'Odenwald rendent théoriquement possible le rôle des *Aedes*, dont la femelle survit à l'hiver, et des *Culex* et *Theobaldia* pendant les premiers mois du printemps. Peut-être les tiques jouent-elles aussi parfois un rôle ; on a prouvé expérimentalement que l'encéphalite de Saint-Louis pouvait être transmise, non seulement par les *Culex*, les *Aedes* et les *Theobaldia*, mais aussi par *Dermacentor variabilis* (Blattner et Heys).

En résumé, il nous semblerait possible d'admettre que, dans l'encéphalite observée par nous, le réservoir de virus est un animal sauvage et que l'agent peut être transmis à l'homme par des arthropodes, probablement des moustiques, mais peut-être aussi des tiques. La contagion directe d'homme à homme ne semble pas se produire.

IV

L'épidémie observée peut-elle se ramener à une des encéphalites déjà connues ?

Au moment des premières observations, on avait pensé à l'encéphalite léthargique (von Economo) en raison des symptômes et du caractère sporadique de la maladie. Le fait qu'une épidémie de grippe avait, comme dans le cas de l'encéphalite de von Economo, il y a trente ans, accompagné l'encéphalite du Palatinat, semblait rapprocher les deux affections : dans les deux cas, l'encéphalite avait débuté avant et avait continué après la grippe ; dans les deux cas également, les deux épidémies avaient eu lieu après une grande guerre ; enfin, les âges frappés étaient sensiblement les mêmes dans les deux cas ; comme von Economo, nous avons constaté une plus forte atteinte du sexe féminin. Mais les objections soulevées par Standacher et Höhn, par les cliniciens, contre un rapprochement entre les deux maladies sont une évolution de notre encéphalite plus bénigne que celle de von Economo et l'absence de parkinsonisme post-encéphalitique. Les objections au point de vue épidémiologique se fondent sur le fait que l'encéphalite léthargique avait une plus forte tendance

à l'extension et s'était répandue plus rapidement à des pays et même à des continents, alors que l'épidémie de 1947-1949 était nettement localisée, et, au cours de deux années, n'a presque pas dépassé les limites de son premier domaine. Cette localisation a été particulièrement nette à Spire, où l'encéphalite est apparue à des intervalles assez réguliers entre décembre 1947 et mars 1949. Le caractère saisonnier des deux maladies constitue également une différence importante entre elles. Von Economo a remarqué, soutenu en cela par les observations de Hoff, que l'encéphalite léthargique était une maladie d'hiver qu'on observait surtout dans les premiers mois de l'année. Loeffler s'est rallié à cette opinion. Or, l'épidémie du Palatinat a présenté un caractère opposé : dans les mois d'hiver, il y eut peu de cas ; ceux-ci furent nombreux au contraire, au printemps, en été et à l'automne ; elle doit donc être rangée dans le groupe des « encéphalites d'été », qui se rencontrent, avec des modalités diverses, en Russie, en Extrême-Orient, en Afrique et en Amérique.

On peut, dès maintenant, considérer qu'il ne s'agit pas de l'encéphalite équine américaine, virus Est ou Ouest, celle-ci étant une maladie du cheval à mortalité élevée, qui ne frappe qu'assez rarement l'homme et, en particulier, les jeunes enfants. L'encéphalite du cheval n'a jamais, à notre connaissance, été observée en Europe.

L'encéphalite du Palatinat offre une certaine ressemblance avec le louping-ill, maladie qui présente des rapports immunologiques avec l'encéphalite verno-estivale russe, et dont le rythme saisonnier est déterminé par la biologie de la tique vectrice (*Ixodes persulcatus*) qui attaque facilement l'homme. Le maximum de morbidité se rencontre en mai et juin, c'est-à-dire dans les mois où les tiques sont le plus actives. Smorodintseff considère comme caractéristique le fait que l'encéphalite russe d'Extrême-Orient se rencontre dans des fermes qui se trouvent dans la partie de cette région située dans un climat tempéré, mais humide. Nos connaissances sur l'épidémiologie de cette maladie sont plus étendues que celles concernant les autres encéphalites à virus, en ce sens qu'on admet des rongeurs sauvages comme réservoirs de virus (rat fouisseur, peut-être aussi hamster, etc.) ; l'infection se répand chez eux par les tiques, qui, à leur tour, infectent l'homme. Les sujets travaillant dans les forêts, et qui sont assez souvent atteints, ne jouent pas de rôle dans le cycle de l'infection, la maladie ne se transmettant pas d'homme à homme. La mortalité s'élève à 30 p. 100.

Aux encéphalites d'été appartiennent aussi l'encéphalite japonaise type B, l'encéphalite du Nil et l'encéphalite de Saint-Louis, dont les agents, comme l'a montré Casals, ont entre eux des rapports immunologiques. La parenté des agents est confirmée

par la similitude de l'épidémiologie. L'encéphalite japonaise apparaît, à cause du rôle que jouent les moustiques (*Aedes*, *Culex*), aux époques chaudes de l'année : sur plus de 12.000 cas survenus en dix ans, 90 p. 100 se sont produits en août et septembre. Les âges avancés sont surtout frappés : 60 p. 100 des malades avaient plus de cinquante ans ; parmi eux, la mortalité s'est élevée de 65 à 80 p. 100 ; parmi les malades plus jeunes, de 50 à 55 p. 100. On connaît cependant des épidémies (Okinawa, 1945) dans lesquelles les enfants ont été atteints en grand nombre. On suppose que les réservoirs de virus sont les animaux domestiques, en particulier les chevaux et les poules, bien qu'on manque, sur ce point, de preuves définitives. Des *Culex tritaeniorhynchus* et des *Culex pipiens* ont été trouvés infectés dans la nature. Avec ces deux espèces de *Culex*, de même qu'avec *Aedes vexans*, on peut transmettre le virus aux animaux de laboratoire.

Sur l'épidémiologie de l'encéphalite du Nil (Smithburn et autres), on ne sait presque rien.

En ce qui concerne l'encéphalite de Saint-Louis, la plupart des cas de la première grande épidémie qui a donné son nom à la maladie se sont produits à la fin de l'été et en automne. Ce rythme saisonnier est conditionné par l'insecte vecteur, les moustiques de l'espèce *Culex* (*C. pipiens* et *tarsalis*) qui ont été trouvés naturellement infectés dans la région atteinte. En outre, le virus peut être transmis expérimentalement de souris à souris par d'autres espèces de *Culex* et par certains *Aedes* (*Aedes vexans*) et *Theobaldia* (Hammon et Reeves), et enfin par les tiques *Dermacentor variabilis* (Blattner et Heys). Bien que plusieurs espèces de rongeurs soient réceptives à l'agent infectieux, leur rôle dans l'épidémiologie de cette encéphalite est encore tout à fait inconnu. Des rongeurs capturés dans le voisinage de foyers infectieux étaient exempts de virus. Récemment, on a aussi soupçonné les oiseaux d'être des réservoirs de virus, parce qu'on avait trouvé le virus chez la tique *Dermanyssus gallinae*. Une des caractéristiques de cette maladie, d'après Blattner et Heys, c'est son rapport avec les cours d'eau ; on la rencontre plus rarement dans les villes et, dans ce cas, à la périphérie et dans les faubourgs. Une autre caractéristique est son apparition sporadique. Elle a peu de tendance à s'étendre.

Il est incontestable que l'encéphalite du Palatinat présente plusieurs des traits épidémiologiques des encéphalites d'été ; en particulier, la courbe saisonnière de morbidité, bien que la répartition des cas parmi les mois chauds ne soit absolument ni celle de l'encéphalite russe avec sa prévalence au printemps, ni celle de l'encéphalite japonaise ou de l'encéphalite de Saint-Louis avec leur prévalence aux mois d'été chauds et aux mois d'automne. Ici, nous devons rappeler la réserve que nous avons faite au

début en ce qui concerne la généralisation de nos courbes. On est d'accord pour reconnaître le caractère sporadique des différentes encéphalites d'été dont la cause est la propagation hétérogène-hétéronome et l'impossibilité de leur transmission d'homme à homme. Ceci est prouvé pour l'encéphalite russe. Mais notre encéphalite ne peut être assimilée à l'encéphalite russe, puisqu'on n'a pas mis de tiques en évidence d'une façon constante, que la situation géomorphologique est différente, ainsi que le mode de vie des malades. Au contraire, les rapports semblent plus étroits avec l'encéphalite japonaise et surtout avec l'encéphalite de Saint-Louis, et les légères différences observées pourraient s'expliquer facilement par les caractères régionaux de la maladie. La situation géomorphologique de l'encéphalite du Palatinat, en particulier, correspond largement à celle que les auteurs américains donnent comme caractéristique de l'encéphalite de Saint-Louis ; de même la faible tendance à l'extension et le petit nombre des jeunes enfants frappés (bien que ce caractère ne soit pas constant dans toutes les épidémies d'encéphalite de Saint-Louis). Enfin, il faut signaler encore dans ce sens le fait qu'au cours de ces dernières années, on a décrit des cas sporadiques d'encéphalite dont le tableau anatomo-pathologique ressemblait à celui de l'encéphalite de Saint-Louis (Höra, Pette et Döring, Werner). Seule, la culture de l'agent permettra une réponse définitive à ces questions. Ces recherches ont été entreprises, dans notre Institut, par le Dr Bingel.

Le professeur Lépine, de l'Institut Pasteur de Paris, qui a bien voulu, ce dont nous lui sommes très vivement reconnaissants, examiner le matériel d'autopsie d'un malade ayant succombé au stade aigu de l'affection et les sérums de deux autres malades, nous a communiqué les résultats suivants :

Examen histologique du cerveau du malade Remll. — Epaississement de la méninge avec œdème, congestion des vaisseaux de la méninge qui présente une infiltration peu intense, pas de vraie méningite. Congestion de tous les capillaires qui, en quelques points, sont entourés d'une hémorragie. Un peu d'œdème surtout périphérique. Nette infiltration par des lymphocytes et des monocytes (pas de polynucléaires).

A partir de ce cerveau, un singe a été inoculé dans le cerveau ; il n'a rien présenté et a survécu.

Nous avons, d'autre part, inoculé 2 lapins par voie cérébrale et 5 souris. Tous ces animaux n'ont présenté ni température, ni symptômes cliniques quelconques. Ils ont été sacrifiés à des délais variant entre le huitième et le cinquantième jour. Un des lapins présentait un léger œdème méningé avec dilatation ventriculaire, très légère infiltration surtout à la base du cerveau ; quelques cellules présentaient de légères lésions nucléaires. Tous les passages ultérieurs pratiqués sur lapins et souris à partir de ce cerveau sont restés entières.

rement négatifs, les quelques lésions observées s'atténuant et ne présentant pas de caractère spécifique.

Nous avons, à partir des cerveaux des souris, fait des passages sur souris qui sont restés négatifs.

En conclusion, les lésions observées dans le cerveau de ces différents animaux sont trop faibles pour signifier quoi que ce soit ; elles ne sont probablement dues qu'à une irritation passagère et locale due à l'injection intracérébrale.

D'autre part, avec les sérums de trois malades, nous avons tenté la neutralisation du virus herpétique. Deux sur trois des échantillons de sérums neutralisaient notre souche de virus herpétique. Mais ces résultats, ne portant que sur un seul échantillon tardif des malades, ne permettent pas de conclusion définitive.

V. — RÉSUMÉ.

Description de l'épidémiologie d'une encéphalite sévissant dans le Palatinat depuis 1947. Elle est caractérisée par sa préférence pour les mois chauds, la prédominance des cas sporadiques, leur apparition dans les régions rurales et à la périphérie des localités atteintes. Les données épidémiologiques rendent vraisemblable l'existence d'un agent transmis à l'homme par des animaux sauvages réservoirs de virus, avec intervention probable de moustiques et, éventuellement, de tiques. La maladie présente des rapports épidémiologiques assez étroits avec le groupe des encéphalites d'été et, en particulier, avec l'encéphalite de Saint-Louis.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BLATTNER (R. J.) et HEYS (F. M.). *J. exp. Med.*, 1944, **79**, 439.
- [2] CASALS (J.), *J. exp. Med.*, 1944, **79**, 341.
- [3] ECONOMO (C. von). *Die Encephalitis lethargica*, Berlin u. Wien, 1929.
- [4] HAMMON (W. McD.) et REEVES (W. C.). *J. exp. Med.*, 1943, **78**, 241.
- [5] HÖRA (J.), *Beitr. path. Anat.*, 1939, **103**, 280.
- [6] LÖFFLER (H.). *Arch. Psych.*, 1932, **98**, 342.
- [7] PETTE (H.) et DÖRING (G.). *Deutsch. Z. Nervenheilk.*, 1939, **149**, 7.
- [8] SMITHBURN (K. C.), HUGHES (T. P.), BURK (A. W.) et PAUL (J. H.). *Am. J. trop. Med.*, 1940, **20**, 471.
- [9] SMORODINTSEV (A. A.). *Arch. ges. Virusforsch.*, 1940, **1**, 468.
- [10] STAUDACHER (W.) et HÖHN (W.). *Deutsch. med. Wochenschr.* (sous presse).
- [11] WERNER (T.). *Deutsch. Z. Nervenheilk.*, 1939, **149**, 66.

SUR LA DESTRUCTION DU 2-3 BUTANEDIOL ET DE L'ACÉTOÏNE PAR LES MICROBES

I. — CAS DU *BACILLUS SUBTILIS*

par M. HOOREMAN, J.-P. AUBERT, M. LEMOIGNE et J. MILLET.

La possibilité de la destruction ou même de l'utilisation du 2-3 butanediol et de l'acétoïne par les microbes a donné lieu à des travaux nombreux et contradictoires.

Pour plus de clarté, nous examinerons successivement les divers groupements microbiens.

GRUPE DU GENRE *Bacillus*. — Dès 1896, Péré [1], qui avait pris l'acétoïne pour l'aldéhyde glycérique, observe sa formation, sa diminution puis sa disparition dans les cultures de *B. subtilis*. En 1904, Desmots [2] montre qu'il s'agit, en fait, de l'acétoïne qui, effectivement, disparaît dans les cultures âgées.

Mais ces auteurs n'envisageaient pas la transformation éventuelle en 2-3 butanediol dans ces conditions d'aérobiose.

L'un de nous, en 1913 [3], a montré que les bacilles de ce groupe, en cultures aérobies, synthétisent toujours, à côté de l'acétoïne, son produit de réduction, le 2-3 butanediol. Il faut donc considérer la somme de ces deux substances, qui passe par un maximum, puis décroît jusqu'à souvent tomber à zéro. Du reste, dès cette époque, le *B. subtilis* a pu être cultivé sur bouillon de haricots avec l'acétoïne comme seul substrat carboné [3].

Il résulterait de ces travaux que ces produits peuvent être utilisés par les organismes qui en font la synthèse.

En 1920, Aubel [4] montre que l'acide pyruvique est un produit intermédiaire de l'utilisation du glycérol par *B. subtilis* et, sans nier expressément leur utilisation possible, estime que le 2-3 butanediol et l'acétoïne s'accumulent alors que l'acide pyruvique est consommé.

Dooren de Jong, en 1926 [5], constate que ni *B. vulgatus*, ni *B. mycoides*, ni *B. vulgare* ne peuvent utiliser le 2-3 butanediol comme aliment carboné. Mais dans ce travail, où l'on ne tient compte ni des acides aminés indispensables, ni des facteurs

de croissance, les résultats négatifs n'ont pas de signification.

En 1928, Williams et Morrow [6], en utilisant la réaction qualitative de Voges et Proskauer, constatent que plusieurs bacilles font disparaître l'acétoïne, mais ils n'envisagent pas la formation éventuelle de 2-3 butanediol.

En 1932, Lafon [7] considère que l'acétoïne est peu labile et que, dans les milieux où l'on a pu l'identifier, il a tendance à s'accumuler.

Horowitz, Vlassova et Radionova, en 1933 [8], constatent que *B. subtilis* transforme le 2-3 butanediol en acétoïne qui, par oxydation spontanée, donne du diacétyle dans les vieilles cultures. Mais, d'après le graphique donné par les auteurs, l'acétoïne semble s'accumuler, inutile, dans le milieu.

Récemment, dans deux travaux importants sur la glycolyse par *B. subtilis* (Ford), Neish, Blackwood et Ledingham, en 1945 [9], et Blackwood, Neish, Brown et Ledingham, en 1947 [10], n'envisagent pas ce problème, mais agissent comme si le 2-3 butanediol et l'acétoïne étaient des produits terminaux.

Les travaux de R. Porter, C. S. McCleskey et M. Levine [11] en 1937, ceux de Ledingham, Adams et Stanier en 1945 [12], ceux de Stahley et Werkman en 1942 [13] et ceux de Blackwood et Ledingham en 1947 [14] conduisent aux mêmes conclusions en ce qui concerne *Aerobacillus polymyxa*.

Ainsi, au début, les auteurs avaient tendance à considérer ces produits en C_4 , comme transitoires et pouvant être utilisés par les bacilles qui les formaient, alors que peu à peu la tendance contraire s'affirme qui les fait apparaître comme des substances de déchets inutilisables, qui s'accumulent dans le milieu comme l'alcool dans la fermentation du glucose par la levure.

GRUPE DES ENTÉROBACTÉRIACÉES. — Harden et Walpole, en 1906, avec *B. lactis aerogenes* (maintenant *Aerobacter aerogenes*) [15], Harden et Norris, en 1912, avec *B. lactis aerogenes* et *B. cloacæ* (maintenant *Aerobacter cloacæ*) [16], puis J. Thompson avec ce même organisme [17] étudient la formation du 2-3 butanediol et de l'acétoïne et les considèrent, implicitement, comme des produits terminaux. Tous ces essais sont faits dans des conditions d'anaérobiose presque totale.

Les bactériologistes utilisaient couramment la réaction de Voges et Proskauer qui est due à l'acétoïne et la considéraient comme stable, donc l'acétoïne comme un produit également stable. En 1927, Paine [18] signale qu'avec certaines souches de *B. aerogenes*, la réaction de Voges et Proskauer positive avec des cultures assez jeunes, devient négative avec des cultures âgées. Ce fait avait déjà été observé et était attribué à un épuisement de la peptone. Paine montre, en fait, que cela est dû à la dispa-

rition de l'acétoïne. Dooren de Jong [5] constate qu'une souche de *B. aerobacter* peut utiliser le 2-3 butanediol comme seule source carbonée.

En 1928, Williams et Morrow [6] confirment les résultats de Paine et montrent que certaines souches du groupe *Aescherichia aerogenes* peuvent détruire l'acétoïne, mais ils n'ont pas envisagé une transformation possible en 2-3 butanediol.

En 1938, Tomiyasu [19], dans une série de mémoires, montre que certaines souches de *B. lactis aerogenes* détruisent l'acétoïne avec production d'acide acétique. La même année, Tittsler arrive à des résultats analogues en utilisant 175 souches de bactéries du groupe *Aescherichia aerogenes*. La moitié des souches d'*Aerobacter aerogenes* et d'*Aerobacter crypticum* détruisent l'acétoïne et, sauf exception, peuvent même l'utiliser comme aliment carboné. L'autre moitié des souches de ces espèces et toutes les souches d'*Aerobacter cloacæ*, d'*Aerobacter levens*, d'*Aescherichia aerobacter*, sont incapables d'attaquer l'acétoïne [20]. En 1944, par la méthode des « resting bacteria », R. Y. Stanier et S. B. Fratkin [35] montrent que *Aerobacter aerogenes* déshydrogène le 2-3 butanediol en acétoïne qui, lui-même, est en partie oxydé.

Ainsi, dans le cas de ces bactéries facultatives, le problème de l'utilisation ou de la destruction de l'acétoïne et du 2-3 butanediol paraît surtout dépendre des espèces microbiennes et même des souches d'une même espèce.

BACTÉRIES ANAÉROBIES STRICTES. — En 1927, Wilson, Peterson et Fred [21] considèrent que dans la fermentation acétonobutylique provoquée par *Clostridium acetobutylicum*, l'acétoïne formée en petites quantités est un produit final alors qu'en 1937 Yamasaki et Takasaki Karashima [22] constatent que, dans ce cas, l'acétoïne disparaît, bien qu'il ne se forme pas de 2-3 butanediol.

La même année, Langlykke, Peterson et Fred [23] notent, avec *Clostridium butylicum* une réduction de l'acétoïne en 2-3 butanediol. En 1938, Brown, Stahley et Werkman [24] arrivent à des résultats divers. Les ferments butyriques formeraient deux groupes. Le premier comprend des microbes comme *Cl. acetobutylicum* et *Cl. felsineum* qui produisent de l'acétoïne, mais ne le réduisent pas en 2-3 butanediol. Le deuxième groupe est constitué de bactéries qui ne forment pas d'acétoïne, mais peuvent réduire ce produit en butanediol. Mais, dans tous les cas, ces produits ne seraient pas métabolisés ultérieurement.

MICROORGANISMES DIVERS. — L'un de nous a montré, en 1923, que *B. proteus* [25] forme du 2-3 butanediol et de l'acétoïne qui

disparaissent peu à peu, alors que Williams et Morrow, en 1928, n'ont pas pu mettre cette disparition en évidence [6].

D'après les mêmes auteurs, l'acétoïne ne serait pas non plus détruite par les *Salmonellées*.

L'un de nous a montré, en 1919 [26], que deux souches de *Bacillus prodigiosus* (actuellement *Serratia marcescens*) produisent de l'acétoïne et du 2-3 butanediol. Pederson et Breed ont retrouvé ce fait en 1928 [27]. Dans ce cas, bien que des études systématiques n'aient pas été faites à ce sujet, ces produits semblent s'accumuler dans les milieux de culture.

Il en est de même dans le cas de *Staphylococcus pyogenes aureus* (actuellement *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*) qui, comme l'un de nous l'a démontré en 1913, produit de l'acétoïne et du 2-3 butanediol [28, 29] et dans celui du *Pseudomonas lindneri* Kluwer [30]. D'après Grivski, le 2-3 butanediol est consommé par *Mycoderma aceti* et *Bacterium xylinum* [31]. Enfin, dans le cas des levures, l'acétoïne et son produit de réduction, qu'ils se forment par addition d'aldéhyde acétique à un moût glucosé en pleine fermentation ou dans une fermentation normale, semblent être des substances finales (C. Neuberg et Reinfurth [32].

De l'ensemble de ces résultats il semble que la disparition du 2-3 butanediol et de l'acétoïne sous l'action des bactéries soit avant tout une question d'espèce et même de souches d'une même espèce. D'autre part, surtout dans le cas des bacilles voisins du *B. subtilis*, la tendance des premiers auteurs était plutôt de considérer ces substances comme des produits intermédiaires transitoires alors que la tendance actuelle, exprimée ou sous-entendue, est de les envisager comme des déchets inutiles qui s'accumulent dans le milieu comme l'alcool dans la fermentation du sucre par la levure.

Nous avons repris cette question, dans le cas seulement des bacilles, avec deux espèces : *B. subtilis* et *B. megatherium*.

I. — DESTRUCTION DU 2-3 BUTANEDIOL ET DE L'ACÉTOÏNE PAR UNE BACTÉRIE DU GROUPE DU *Bacillus subtilis*.

TECHNIQUES. — Le bacille utilisé est la souche B. G₂ F du Service des fermentations. Il répond aux caractères de l'ancienne espèce *B. mesentericus*, variété *Globigii*, et est grand producteur d'acétoïne et de 2-3 butanediol.

Nous l'avons choisi, car il pousse très bien dans un milieu minéral avec le glucose comme seul aliment carboné et du nitrate de potassium ou sodium comme seule source azotée, sans acides aminés et sans facteurs de croissance autres que ceux

apportés par la semence et les produits dont le milieu est formé.

Le milieu a la composition suivante :

PO_4KH_2	5 g.
SO_4Mg , $7\text{H}_2\text{O}$	0,15 g.
SO_4Mn , $4\text{H}_2\text{O}$	0,03 g.
SO_4Fe , $7\text{H}_2\text{O}$	0,03 g.
NO_3K	10 g.
NaOH N	25 cm ³
Eau de source	Q. S. 1.000 cm ³

Le glucose est stérilisé à part et ajouté aseptiquement à raison de 35 g. par litre de milieu final, dont le pH, après stérilisation, est amené à 6,8-7.

Quand nous avons voulu étudier l'action de la concentration en azote, nous avons fait varier les quantités de nitrate de potassium comme il sera indiqué par la suite.

Les dispositifs expérimentaux variant avec les essais seront indiqués au fur et à mesure.

A la fin, la culture est amenée à un volume connu. On détermine le pH avec une électrode de verre et tous les autres dosages sont faits sur des parties aliquotes.

MATIÈRE SÈCHE. — Après centrifugation, le culot microbien est lavé avec l'eau distillée, puis desséché à 100-110° jusqu'à poids constant.

Le 2-3 butanediol et l'acétoïne sont dosés par la méthode de Hooreman [33].

Le glucose est dosé par la méthode de G. Bertrand. Mais l'acétoïne réduit la liqueur de Fehling et une correction est nécessaire. En partant d'acétoïne purifié, cristallisé, nous avons constaté que, dans les conditions expérimentales de la méthode de G. Bertrand, 1 mg. d'acétoïne exige 0,437 cm³ de MnO_4K *n*/10.

RÉSULTATS.

INFLUENCE DE L'AÉRATION DE LA CULTURE. — Pour étudier l'influence de l'aération nous faisons simplement varier la surface libre d'un volume donné de liquide en fermentation, en utilisant des récipients de forme ou de positions différentes : nous répartissons le liquideensemencé dans des boîtes de Roux de 1 litre ou dans des flacons d'Erlenmeyer de 500 cm³, stérilisés au préalable, à raison de 100 cm³ par récipient. Dans une étuve maintenue à 31°, nous posons les boîtes de Roux soit debout (milieu faiblement aéré), soit à plat (milieu moyennement aéré), et nous fixons les flacons d'Erlenmeyer sur un agitateur mécanique faisant par minute 90 oscillations de 8 cm. d'amplitude environ (milieu fortement aéré).

Nos résultats sont rassemblés dans le tableau I. La figure 1 représente la variation en fonction du temps de la somme butanediol + acétoïne dans les boîtes de Roux posées debout et posées à plat, et dans les flacons d'Erlenmeyer agités.

TABLEAU I.

INTENSITÉ de l'aération	DURÉE DE L'ESSAI en jours	GLUCOSE détruit		B. D. (mg.)	A. C. (mg.)	B. D. + A. C.		POIDS S + C des corps microbiens (mg.)	RENDMENT p. 100
		milligrammes	millimolécules			milligrammes	millimolécules		
<i>Faible :</i>									
Boîtes de Roux posées debout. Glucose au début : 3.560 mg.	3	680	3,8	22	32	54	0,6	153	15
	4	1 130	6,3	36	97,5	163,5	1,5	160	21
	6	2 130	11,8	135	267	402	4,6	185	38
	7	2.670	14,8	137	394	531	6,0	187	41
	9	3 160	17,5	144	626	770	8,7	170	49
	11	3 560	19,8	0	448	448	5,1	185	26
	17	3 560	19,8	51	224	275	3,1	180	15
<i>Moyenne :</i>									
Boîtes de Roux posées à plat. Glucose au début : 3.300 mg.	2	300	1,7	3,5	8,5	12	0,13		7
	3	1.820	10,1	16,5	76,5	93	1,05		10
	4	3.200	17,8	14	305	319	3,6	515	20
	5	3 300	17,8	11	100	112	1,4	294	7
<i>Forté :</i>									
Flacons d'Erlenmeyer, agités. Glucose au début : 3.300 mg.	2	3.300	18,3	29	95	124	1,44	543	6
	4	3.300	18,3	6	1	7	0,08	275	0,4

B. D., 2-3 butanediol.; A. C., acétoïne.

Le rendement est exprimé par : $\frac{\text{millimol. B. D. + A. C. formés}}{\text{millimol. glucose détruit}} \times 100$.

Dans la colonne rendement nous indiquons le nombre de molécules de 2-3 butanediol et d'acétoïne formées pour 100 molécules de glucose métabolisé.

Nous exposerons d'abord les constatations ressortissant aux premières phases de la fermentation, antérieures à l'épuisement du glucose, et pendant lesquelles il y a production de butanediol et d'acétoïne. Nous exposerons ensuite les constatations ressortissant aux dernières phases de la fermentation, postérieures à l'épuisement du glucose.

Nous voyons que plus l'aération est intense, plus la glycolyse est rapide, plus la formation de matière sèche microbienne est grande et plus petite, au contraire, est la formation de 2-3 buta-

nediol et d'acétoïne. A ce point de vue qui nous intéresse particulièrement, la colonne 10 indique le nombre de molécules de ces produits en C_4 formées par 100 molécules de glucose métabolisé.

Ce rendement est infime avec une forte aération. Plus élevé avec une aération moyenne où il atteint 20 p. 100 et presque 50 p. 100 avec une aération faible. En anaérobiose, le bacille ne se développe pas et il n'y a pas production d'acétoïne ni de 2-3 butenediol.

Ce fait ressort encore mieux si nous considérons les quantités

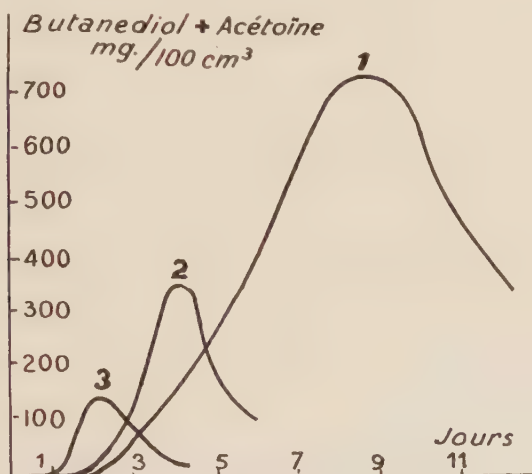


FIG. 1. — 1, aération faible; 2, aération moyenne; 3, aération forte.

de glucose détruit et d'acétoïne et de butanediol formés et le rendement, non pas depuis l'origine, mais entre les diverses prises d'échantillons.

C'est ce qui est indiqué dans le tableau II.

Au début de la culture le rendement en butanediol et en acétoïne est faible puis, quand une masse importante de microbes s'est formée et qu'il y a carence partielle d'oxygène, le rendement augmente pour atteindre 100 p. 100.

Ceci signifie qu'au moment où l'oxygène est insuffisant pour le développement microbien mais peut encore servir d'accepteur d'hydrogène, toutes les molécules de glucose se décomposent en subissant la condensation en acétoïne. Si, au contraire, l'oxygène est en excès, tout le glucose sert à l'édification des corps microbiens et il ne se forme plus d'acétoïne ou il ne s'en forme que des traces. Il y a là un phénomène qui, tout au moins dans ses appa-

TABLEAU II.

AÉRATION	PÉRIODES en jours	EN MILLIMOLÉCULES pour 100 cm ³ de milieu		RENDEMENT p. 100
		Glucose disparu	A. C. + B. D. formés	
Faible	3 à 4	2,5	4,1	44
	4 à 6	5,5	2,9	52
	6 à 7	3,0	4,4	47
	7 à 9	2,7	2,7	100
Moyenne	2 à 3	8,4	0,9	11
	3 à 4	7,7	2,6	33

rences, est tout à fait comparable à l'effet Pasteur dans le cas de la glycolyse par la levure.

Nous discuterons les interprétations que l'on peut donner à ce fait, quand nous aurons étudié l'action de l'alimentation azotée.

Les résultats que nous avons obtenus sont apparemment différents quand on arrête la culture trop tôt ou encore quand, maintenant la surface, on augmente le volume.

C'est ce qui explique que Adams et Leslie aient, apparemment, obtenu des résultats contraires aux nôtres [34].

Dans une première série d'expériences, comme nous, ils font des cultures à volume constant et à surfaces variables, mais ils arrêtent la culture après quatre-vingt-seize heures, ce qui est tout à fait légitime pour leurs recherches qui sont industrielles.

Si nous avons fait de même, nous aurions conclu que la culture moyennement aérée donne plus de 2-3 butanediol que la culture peu aérée (voir figure 1, courbes 2 et 1) et que, par suite, l'aération favorise la production de cette substance, alors qu'en fait elle ne fait que favoriser le développement microbien et, par conséquent, accélérer la glycolyse.

De même, si l'on fait des cultures à surface constante et volumes variables, le développement microbien dépend de la surface et quand le volume augmente, il y a dilution du butanediol formé. C'est ce que nous avons pu constater avec *B. subtilis*.

B. — DERNIÈRES PHASES DE LA FERMENTATION, POSTÉRIEURES À L'ÉPUISEMENT DU GLUCOSE.

Conformément aux observations de Péré [4] et Lemoigne [3], on constate dans chaque série d'expériences que le butanediol et l'acétoïne, produits pendant les premières phases de la fermenta-

tion, sont détruits partiellement ou complètement dans les dernières phases de celle-ci (fig. 1).

Toutefois, comme il est indiqué ci-dessus, en milieu faiblement aéré, l'épuisement du glucose n'a lieu qu'au bout de dix jours ; ensuite seulement se manifeste la destruction du butanediol et de l'acétoïne, qui est donc retardée mais non supprimée. Il est clair que si l'on n'avait pas suffisamment prolongé l'expérience on aurait pu abusivement nier cette destruction ; c'est là une cause d'erreur qui explique, semble-t-il, beaucoup des contradictions de la littérature.

La destruction en question n'a d'ailleurs pas pour contre-partie une continuation de la croissance microbienne : le tableau I montre que pendant les dernières phases de la fermentation au cours desquelles cette destruction se manifeste, le poids sec des corps microbiens n'augmente plus ou même diminue fortement. Mais si cette destruction n'est pas liée à une croissance microbienne, peut-être joue-t-elle quelque autre rôle important, que nous ne pouvons pas encore actuellement préciser.

INFLUENCE DU RAPPORT DE LA CONCENTRATION DU MILIEU EN AZOTE A SA CONCENTRATION EN GLUCOSE. — Les résultats donnés dans le paragraphe précédent montrent, en particulier, que la forte production de corps microbiens provoquée par une aération du milieu suffisamment intense correspond à une faible production de butanediol et d'acétoïne. Ceci nous a conduits à étudier comment varient la production et la destruction consécutive du butanediol et de l'acétoïne, quand on agit sur la production des corps microbiens en faisant varier un autre facteur que l'aération du milieu. Nous avons choisi comme variable le rapport de la concentration initiale du milieu en azote à sa concentration en glucose.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE. — Nous utilisons un milieu ayant la même composition et le même pH initial que celui du paragraphe précédent, hormis les deux modifications suivantes :

Nous adoptons une concentration initiale en glucose de 1.100 mg. pour 100 cm³ au lieu de 3.300 mg. pour 100 cm³, afin de diminuer la durée des différentes séries d'expériences ;

Comme aliment azoté nous choisissons, au lieu de nitrate de potassium, du carbonate d'ammonium dans le but de diminuer la variation du pH au cours du développement.

Pour étudier l'influence du rapport de la concentration du milieu en azote à sa concentration en glucose, nous laissons fixe la concentration initiale en glucose, et faisons varier la concentration initiale en carbonate d'ammonium d'une série d'expériences à l'autre.

Nous utilisons la même souche que dans le paragraphe précédent, et nous répartissons le milieuensemencé dans des boîtes de

Roux stérilisées au préalable, à raison de 100 cm³ par boîte. Nous posons ces boîtes de Roux à plat, dans une étuve maintenue à 31°.

Comme précédemment, nous déterminons à intervalles réguliers le poids sec des microbes, le butanediol, l'acétoïne et le glucose. Nous déterminons, en outre, la quantité d'azote contenue dans le milieu, initialement sous forme de carbonate d'ammonium.

RÉSULTATS. — Nos résultats sont exprimés par le tableau III et la figure 2, qui sont analogues au tableau I et à la figure 1 du paragraphe précédent.

TABLEAU III.

QUANTITÉS D'AZOTE dans 100 cm ³ de milieu (mg.)	DURÉE DE L'ESSAI en jours	GLUCOSE détruit		B. D. (mg.)	A. C. (mg.)	SOMME B. D. + A. C.		POIDS SEC des microbes	RENDEMENT p. 100
		milligrammes	millimolécules			milligrammes	mil inolécules		
N : 5,9 mg. Glucose au début : 1.100 mg.	1	180	1	1,4	2,4	3,8		58	
	2	370	2	23	24	47	0,5	67	25
	3	600	3,3	73	30	103	1,2	61	36
	5	810	4,5	165	43	208	2,4	65	53
	6	935	5,2	209	57	266	3,0	58	57
	7	1.100	6,1	198	115	313	3,6		59
	16	1.100	6,1	60	230	290	3,3	55	54
N : 14,6 mg. Glucose au début : 1.040 mg.	1	175	0,7	0,65	1,1	1,75			
	2	570	3,2	42,5	33,5	76	0,8	127	25
	3	1.005	5,6	73	135	208	2,4	70,5	43
	5	1.040	5,8	3	178	181	2,0	66	34
	6	1.040	5,8	0	169	169	1,9		
	8	1.040	5,8	0	153	153	1,7	55	
	14	1.040	5,8	0	106	106	1,2		
N : 21,6 mg. Glucose au début : 1.070 mg.	1	590	3,3	1,3	20	24,3	0,3	126	9,1
	1,25	1.070	6,0	93	86	179	2,0	164	33
	2	1.070	6,0	19	141	160	1,8	152	
	2,25	1.070	6,0	10	115	125	1,4	142	
	3	1.070	6,0	1	6	7		142	
N : 69 mg. Glucose au début : 1.100 mg.	1	160	0,89	0	3,4	3,4			
	1,6	820	4,5	22	81	103	1,2	221	27
	2	1.100	6,1	22	160	180	2,0	236	33
	3	1.100	6,1	0	50	50	0,5	219	8
	4	1.100	6,1	0	30	30	0,3	194	

Pour exposer les constatations qui découlent de ces résultats, nous suivrons le même plan que dans le paragraphe précédent.

A. PREMIÈRES PHASES DE LA FERMENTATION, ANTÉRIEURES À L'ÉPUISEMENT DU GLUCOSE. — Plus la concentration du milieu en azote

est forte, et, par suite, plus la production des corps microbiens est forte, plus faible est la production de butanediol et d'acétoïne : suivant que cette concentration, en milligrammes d'azote pour 100 cm^3 du milieu est de 5,9, 14,6, 21,6 ou 69, les valeurs maxima trouvées sont, pour le poids sec des corps microbiens, 67, 127, 164 ou 236 mg. et pour la somme butanediol + acétoïne 313, 208, 179, 180 mg.

Au début du développement, 25 à 33 p. 100 au plus des

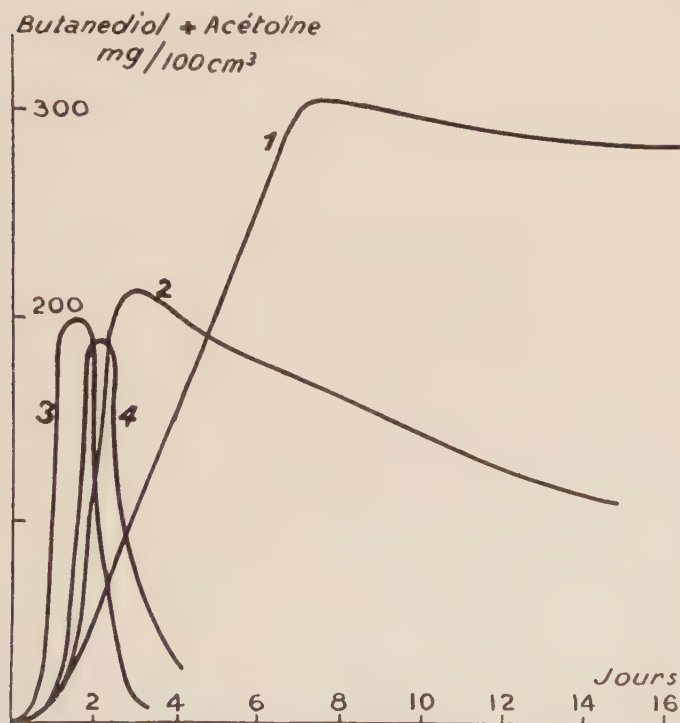


FIG. 2 — 1, 5,9 mg. N; 2, 14,6 mg. N; 3, 21,6 mg. N; 4, 69 mg. N.

molécules de glucose servent à la synthèse du 2-3 butanediol et de l'acétoïne. Quand la croissance approche du maximum, ce rendement augmente surtout quand il y a carence d'azote. Mais ici encore, les résultats sont plus nets quand on calcule ces rendements non pas depuis le début de la culture, mais entre les diverses périodes où l'on fait les prises d'essais.

Nous avons ainsi obtenu le *tableau IV*.

Le maximum est obtenu un peu avant l'épuisement en glucose et le début de l'autolyse.

TABLEAU IV.

DOSES D'AZOTE en milligrammes	PÉRIODES en jours	EN MILLIMOLÉCULES pour 100 cm ³ de milieu		RENDEMENT p. 100
		Glucose disparu	A. C. + B. D. formés	
5,9	1 à 2	1	0,5	50
	2 à 3	1,3	0,7	53
	3 à 5	1,2	1,2	100
	5 à 6	0,7	0,6	85
14,6	1 à 2	2,23	0,8	36
	2 à 3	2,4	1,6	66
21,6	1 à 1,25	2,7	1,7	63
69	1,5 à 2	1,6	0,8	50

Quand il y a suffisamment d'azote, ce rendement maximum est de 50 p. 100, alors que, quand il y a carence de cet élément, le rendement atteint jusqu'à 100 p. 100. Tout le glucose est, à ce moment, transformé en acétoïne comme dans le cas d'une carence partielle en oxygène.

Nous ferons encore remarquer que dans la série d'expériences correspondant à la plus faible concentration en azote, la production du butanediol pendant les premières phases de la fermentation est nettement supérieure à la production d'acétoïne ; c'est au contraire l'inverse qui a lieu pour les autres séries d'expériences de ce paragraphe et du paragraphe précédent. Nous ne pouvons pas, pour le moment, proposer une interprétation claire de ce fait.

De plus, comme dans le cas de l'action de l'acétoïne, si les analyses sont faites tôt les premier, deuxième ou troisième jours, ce sont les milieux les plus riches en azote qui paraissent donner les plus fortes quantités de butanediol et d'acétoïne.

B. DERNIÈRE PHASE DE LA FERMENTATION POSTÉRIEURE A L'ÉPUISEMENT DU GLUCOSE. — Comme le montre le tableau III, et plus particulièrement la figure 2, c'est seulement dans un milieu suffisamment riche en azote que la destruction du butanediol et de l'acétoïne est effective. Ainsi, dans la première série d'expériences, correspondant à la plus faible concentration du milieu en azote, cette destruction est pratiquement supprimée. Il s'agit bien là d'une suppression de la destruction, et non d'un simple retard comme dans la première série d'expériences du paragraphe précédent ; on peut s'en convaincre en comparant les

courbes qui traduisent les variations de la somme butanediol + acétoïne en fonction du temps (fig. 1, courbe 1 et fig. 2, courbe 1), en fin d'expérience, la première de ces courbes s'infléchit brutalement tandis que la seconde présente un palier sensiblement horizontal. Dans le cas des milieux relativement pauvres en azote (5 mg. d'azote pour 1.000 mg. de glucose dans 100 cm³ de milieu), le butanediol et l'acétoïne apparaissent ainsi comme des produits terminaux de la glycolyse ; au contraire, dans des milieux plus riches en azote, ces composés sont détruits pendant les dernières phases de la fermentation. La destruction du butanediol et de l'acétoïne semble donc être en relation avec le métabolisme azoté.

Sur le rôle éventuellement joué par cette destruction, nous pouvons présenter les mêmes observations que dans le paragraphe précédent.

DISCUSSION.

Nous voyons qu'avec une seule espèce, une seule variété microbienne productrice d'acétoïne et de 2-3 butanediol, nous pouvons à volonté faire s'accumuler ou disparaître ces produits dans le milieu.

Quand le développement microbien est assez avancé, une carence en un élément essentiel, oxygène ou azote, arrête ou ralentit la synthèse de la matière vivante sans entraver la glycolyse. Tout ou presque tout le glucose se transforme en acétoïne et en 2-3 butanediol.

Si, au contraire, toutes les conditions sont réalisées pour un développement microbien maximum, ces produits ne se forment qu'en petites quantités ou même disparaissent complètement.

Ces expériences nous montrent que la destruction de l'acétoïne et du 2-3 butanediol par les microorganismes n'est pas seulement une question d'espèce ou même de souche, comme on l'admet en général, mais est aussi une question de conditions physiologiques. Beaucoup de contradictions dans la littérature peuvent être ainsi expliquées.

Mais ces expériences posent, en outre, une autre question. On peut se demander si, au cours du développement, l'acétoïne est un produit intermédiaire nécessaire de la glycolyse. L'acétoïne formé serait utilisé au fur et à mesure de sa formation quand les conditions de développement sont favorables. Une telle hypothèse explique bien les faits exposés, mais ceux-ci peuvent s'interpréter autrement.

On peut supposer que l'oxygène a une action inhibitrice sur la formation de l'acétoïne comme l'effet Pasteur dans la fermentation alcoolique par la levure. De plus, une anaérobiose complète, dans le cas de ce microbe, empêche la production d'acétoïne : un

accepteur d'H est nécessaire. Mais cette interprétation est sans valeur dans le cas d'une alimentation azotée abondante.

L'hypothèse la plus simple nous semble d'admettre que l'acétoïne provient d'un précurseur, sûrement l'acide pyruvique. Quand les conditions de développement sont favorables, ce précurseur est utilisé au fur et à mesure de sa formation pour la synthèse de la matière microbienne.

Mais s'il y a carence d'un élément indispensable, la croissance est ralentie ou arrêtée et la glycolyse continuant, une grande partie ou la totalité de l'acide pyruvique est transformée en acétoïne qui s'accumule ou est réduit partiellement en 2-3 butanediol.

Quand les conditions deviennent plus favorables ou que la glycolyse s'arrête par épuisement du glucose, l'acétoïne peut être utilisée par l'organisme.

Ce composé apparaît ainsi comme une réserve carbonée, mais extérieure aux microbes, analogue au point de vue physiologique aux réserves lipidiques, utilisables, mais souvent non utilisées.

Dans ce travail nous avons montré que le 2-3 butanediol et l'acétoïne peuvent disparaître, mais nous n'avons pas donné la preuve de leur utilisation par l'organisme.

Cette question fera l'objet de notre deuxième mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PÉRÉ (A.). Ces *Annales*, 1896, **10**, 417.
- [2] DESMOTS. *C. R. Acad. Sci.*, 1904, **138**, 581.
- [3] LEMOIGNE (M.). Ces *Annales*, 1913, **27**, 856.
- [4] AUBEL (E.). *C. R. Acad. Sci.*, 1920, **171**, 478.
- [5] DOOREN DE JONG. Bijdrage tot de Kennis van het mineralisatie-proces, 1926, Rotterdam.
- [6] WILLIAMS (G. B.) et MORROW (M.). *J. Bact.*, 1928, **16**, 43.
- [7] LAFON (M.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 268.
- [8] HOROWITZ, VLASSOVA et RADIONOVA. *C. f. B.*, II, 1932-1933, **87**, 333.
- [9] NEISH (A. C.), BLACKWOOD (A. C.) et LEDINGHAM (G. A.), *Canad. J. Res.*, 1945, **23**, 290.
- [10] BLACKWOOD (A. C.), NEISH (A. C.), BROWN et LEDINGHAM (G. A.). *Can. J. Res.*, 1947, **25**, 56.
- [11] PORTER (R.), McCLESKEY (C. S.) et LEVINE (M.). *J. Bact.*, 1937, **33**, 163.
- [12] LEDINGHAM, ADAMS et STANIER. *Can. J. Res.*, 1945, **23**, 48.
- [13] STAHLEY et WERKMAN. *Biochem. J.*, 1942, **36**, 575.
- [14] BLACKWOOD (A. C.) et LEDINGHAM (G. A.). *Can. J. Res.*, 1947, **25**, 180.
- [15] HARDEN (A.) et WALPOLE (G. S.). *Proceed. Roy. Soc.*, 1906, **77 B**, 399.
- [16] HARDEN (A.) et NORRIS (D.). *Proceed. Roy. Soc.*, 1912, **84 B**, 492.
- [17] THOMPSON (J.). *Proceed. Roy. Soc.*, 1912, **84 B**, 500.
- [18] PAINE (P.). *J. Bact.*, 1927, **13**, 269.
- [19] TOMIYASU (Y.). *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, 1937, **13**, 94.

- [20] TITSLER. *J. Bact.*, 1938, **35**, 157.
- [21] WILSON (P. W.), PETERSON (W. H.) et FRED (E. B.). *J. Biol. Chem.*, 1927, **74**, 495.
- [22] YAMASAKI et TAKASAKI KARASHIMA. *Enzymologia*, 1937, 271.
- [23] LANGLYKKE (A. F.), PETERSON (W. H.) et FRED (E. B.). *J. Bact.*, 1937, **34**, 443.
- [24] BROWN (R. W.), STAHLEY (G. L.) et WERKMAN (C. H.). *Iowa State Coll. J. Sci.*, 1938, **12**, 245.
- [25] LEMOIGNE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88**, 467.
- [26] LEMOIGNE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1919, **82**, 234.
- [27] PEDERSON (C. S.) et BREED (R. S.). *J. Bact.*, 1928, **16**, 163.
- [28] LEMOIGNE (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1913, **157**, 653.
- [29] SEGAL (B.). *J. Bact.*, 1940, **39**, 747.
- [30] SCHREDER (K.), BRUMEER (R.) et HAMPE (R.). *Biochem. Z.*, 1934, **273**, 223-242.
- [31] GRIVSKI. *Bull. Soc. Chim. belge*, 1942, **51**, 63.
- [32] NEUBERG (C.) et REINFURTH (E.). *Biochem. Z.*, 1923, **143**, 553.
- [33] HOOREMAN (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 1257 : *idem*, 1947, **225**, 208 ; et *An. Chem. Acta.*, 1949, **3**, 606.
- [34] ADAMS (G. A.) et LESLIE (J. D.). *Can. J. Res.*, 1946, **12**, 24.
- [35] STANIER (R. Y.) et FRATKIN (S. B.). *Can. J. Res.*, 1944, **22 B**, 140.

SUR LA DESTRUCTION DU 2-3 BUTANEDIOL ET DE L'ACÉTOÏNE PAR LES MICROBES

II. — UTILISATION DU 2-3 BUTANEDIOL PAR *B. MEGATHERIUM*

par M. HOOREMAN, J.-P. AUBERT, M. LEMOIGNE et P. DUPUY

Dans un premier mémoire, nous avons montré qu'un bacille producteur d'acétoïne et de 2-3 butanediol (le *B. subtilis*) peut, suivant les conditions physiologiques, former beaucoup ou peu de ces substances ou les détruire. Mais nous n'avons pas prouvé que ces composés peuvent servir comme source carbonée pour le développement du microbe.

À vrai dire, il y a longtemps que l'un de nous a donné cette preuve en cultivant un *Bacillus subtilis* dans du bouillon de haricots contenant comme substrat carboné de l'acétoïne [1].

Nous avons repris cette question avec *B. megatherium*, qui présente l'avantage de pousser facilement dans un milieu synthétique.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE. — Nous utilisons un milieu de culture synthétique ayant la même composition minérale que le milieu décrit précédemment, mais d'un pH initial de 6,1-6,3. En outre, pour 100 cm³, ce milieu contient : dans l'expérience I, 2.394 mg. de glucose ; dans l'expérience II, 2.394 mg. de glucose et 750 mg. de butanediol ; dans l'expérience III, 1.515 mg. de butanediol.

Nous nous sommes servis de butanediol fourni par la firme hollandaise « N. V. Nederlandsche Gist-en-Spiritus Fabriek » : ce produit, optiquement inactif, purifié par deux distillations successives, avait pour point d'ébullition 178° et pour point de fusion 27° environ.

Nous ensemençons le milieu stérilisé avec une souche de *B. megatherium* entretenue depuis un certain temps par repiquages successifs sur bouillon de haricots gélosé. Cette souche avait des propriétés légèrement différentes de celles que présentent en général les souches fraîchement isolées du sol : elle donnait des proportions moindres de lipide β -hydroxybutyrique et d'acétoïne, et sporulait plus facilement. Depuis nous avons utilisé d'autres souches qui nous ont donné des résultats analogues.

Nous répartissons le milieuensemencé dans des flacons d'Erlenmeyer de 1.000 cm³ stérilisés au préalable, à raison de 100 cm³ par flacon. Dans une étuve maintenue à 31°, nous fixons ces flacons sur un agitateur mécanique faisant par minute 90 oscillations de 8 cm. d'amplitude environ.

Comme dans le mémoire précédent, nous déterminons à intervalles réguliers le glucose, le butanediol, l'acétoïne et le poids sec des corps microbiens.

RÉSULTATS. — L'ensemble de nos résultats relatifs aux expériences I, II et III est donné par le tableau I; la figure 1 se rapporte spécialement à l'expérience II.

TABLEAU I. — Utilisation du glucose et du 2-3 butanediol par *B. megatherium*.

NUMÉRO de l'expérience	DURÉE DE L'ESSAI en jours	POIDS SECS des corps microbiens en mg.	POUR 100 CM ³ DE MILIEU en mg.					DÉTRUIT pour cent du produit initial	
			Glucose		B. D.	A. C.	B. D. + A. C. disparu	Glucose	B. D.
			restant	disparu	restant	restant			
I	0		2.394						
	1	596	80	2.314		+		96,7	
	2	375	0	2.394		+		100	
	3	364	0	2.394				100	
	6	427	0	2.394				100	
II	0		2.394		750	0			
	1	701	90	2.304	684	17	49	96,2	6,5
	2		0	2.394	477	17	256	100	34,1
	3	694	0	2.394	46	+	704	100	93,9
	6	581	0	2.394	40	0	710	100	94,7
III	0		0		1.515	0	0		
	1		0		1.425	24	66		4,3
	3	311	0		770	31	714		47,1
	5	517	0		104	0	1.411		93,1

Nous devons remarquer tout d'abord que la glycolyse est aussi rapide en présence qu'en l'absence de butanediol, ce qui prouve que ce produit, tel que nous l'avons employé, n'a aucune action toxique. Nous voyons, d'autre part, que dans tous les cas le butanediol diminue pour disparaître presque complètement. Il y a simultanément formation d'une petite quantité d'acétoïne qui disparaît rapidement.

Mais, en fait, ici les conditions expérimentales nous permettent de voir qu'il y a, non pas simple destruction du butane-

diol et de l'acétoïne, mais nettement utilisation pour la formation de la substance microbienne.

Si, en présence de glucose, ce fait peut être discuté, il n'en est plus de même dans l'expérience où le 2-3 butanediol est le seul substrat carboné. Au début, le développement microbien semble nul, puis, après une période de latence qui varie de trois à cinq jours suivant les souches et surtout suivant l'ensemencement, la culture se développe et on obtient, aux dépens du

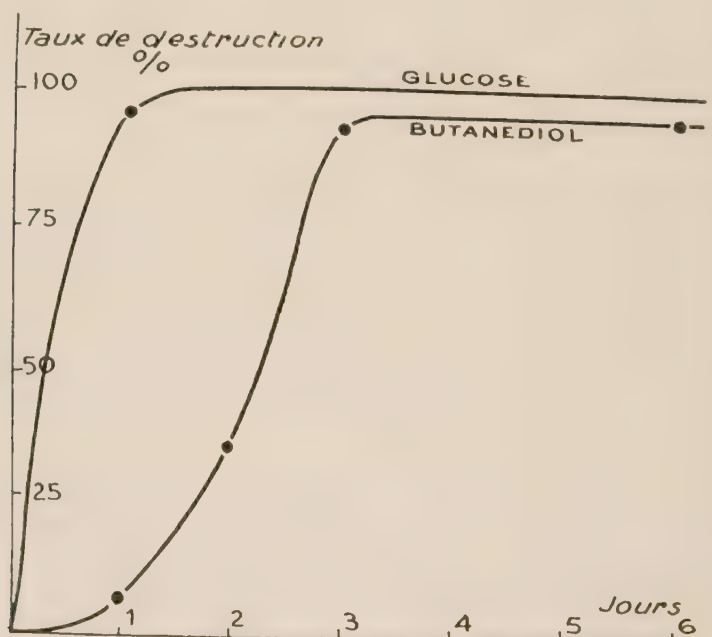


FIG. 1.

butanediol, de belles récoltes. Au microscope, les microbes sont agglutinés par groupes de 5 et 6 et ont des formes levurées et souvent irrégulières. La question des rendements sera étudiée dans un autre travail. L'acétoïne est évidemment le terme intermédiaire métabolisé lui-même. En présence de glucose, l'utilisation du 2-3 butanediol est beaucoup plus rapide puisque, dès que le glucose a disparu, comme le montre très nettement la figure 1, il disparaît presque complètement à son tour.

Le fait que le métabolisme du 2-3 butanediol et de l'acétoïne est favorisé par la glycolyse, conduit à le rapprocher de celui des acides gras qui, dans les tissus animaux supérieurs, ne peuvent être utilisés, tout au moins rapidement, qu'en présence

de glucides ou de produits en dérivant (acides bibasiques du cycle de Krebs).

D'autre part, Hermann et Neuschul, en 1932 [2], Tomiyasu [3], en 1938, ont trouvé de l'acide acétique dans les cultures de divers organismes utilisant l'acétoïne. Doisy et Westerfeld [4] ont constaté, chez les animaux supérieurs, que l'acétoïne favorise notablement l'acétylation de l'acide *p*-aminobenzoïque. D. E. Green, P. K. Stumpf et K. Zarudnaya [5], en 1947, ont trouvé dans les

TABLEAU II.

AU DÉBUT	SÉRIE I			SÉRIE II		SÉRIE III			
<i>Essai en présence de phosphate d'ammonium.</i>									
pH	7,5			7,3		7,3			
B.D. en milligrammes pour 100 cm ³	1.330			0		1.340			
Acide malique	0			1.250		1.250			
APRÈS EN HEURES	27	48	72	27	48	27	48		
pH	7,3	6,8	5,2	8,6	8,9	8			
Matière sèche formée en mg. pour 100 cm ³	75	187	591	134	104	409			
B.D. consommé		328	1.453			646			
Pourcentage du B.D. initial.		25	86,7			48			
AU DÉBUT	SÉRIE I			SÉRIE II		SÉRIE III			
<i>Essai en présence de nitrate de sodium.</i>									
pH	6,3			6,1		6,1			
B.D. en milligrammes pour 100 cm ³	1.515			0		1.590			
Acide malique en mil- ligrammes pour 100 cm ³	0			350		350			
APRÈS EN HEURES	28	72	122	28	72	122	28	72	122
pH	6,3	7,2	7,5	8,4	9	8,5	7,9	8,5	8,9
Matière sèche des microbes en mil- ligrammes pour 100 cm ³ de milieu.	71	311	517	67	67	60	164	157	150
B.D. consommé.		714	1.411				580		
Pourcentage du B.D. initial		47,1	93,1				38,1		

muscles du pigeon et du lapin une diacétyle-mutase qui transforme deux molécules de diacétyle en une molécule d'acétoïne et deux molécules d'acide acétique. Ce dernier acide paraît donc être un dérivé normal de la dégradation de ces produits en C_4 .

Aussi, à défaut d'acide oxalacétique, avons-nous essayé l'action de l'acide malique, comme nous l'avions fait, l'un de nous et Péaud-Lenoël, au sujet de l'utilisation de l'acide acétylacétique [6].

Nous signalerons deux essais, l'un avec du nitrate de K comme aliment azoté et l'autre, pour essayer d'éviter une élévation de pH trop grande, du phosphate d'ammonium. L'acide malique est neutralisé par la soude.

Dans le premier essai, la culture sur butanediol seul n'a été belle qu'après quarante-huit heures et surtout soixante-douze heures, ce qui confirme ce que nous avions vu. Sur milieu ne contenant que le malate comme substrat, le développement est vite arrêté par l'alcalinité trop forte.

Dans le cas du mélange, dès vingt-sept heures, on obtient une très belle culture dont le poids dépasse la somme des poids des cultures dans les deux autres milieux après le même temps : 409 contre $75 + 154 = 229$.

Dans le second essai, les résultats sont identiques. La dose de malate a été réduite. Dans le milieu III on obtient 169 de poids sec, alors que la somme des poids secs dans les deux autres milieux est de $71 + 67 = 138$. La différence dans ce cas est beaucoup moindre. Cela tient vraisemblablement à ce que l'alcalinisation a été plus rapide, l'aliment azoté étant du nitrate de sodium.

Nous voyons donc que l'addition de malate favorise le développement de *Bacillus megatherium* aux dépens du butanediol qui cependant est très bien utilisé, même quand il est seul.

Ces résultats peuvent s'interpréter de deux façons : on peut supposer que le malate permet, dès le début, la multiplication de la semence qui, plus abondante, attaque plus vite le 2-3 butanediol.

On peut admettre aussi, comme c'est le cas avec l'acide acétylacétique, que le malate, sans doute après oxydation en oxalacétate, permet l'utilisation de l'acétoïne ou de ses dérivés. Il y aurait un mécanisme analogue à celui de l'oxydation des acides gras dans les tissus des animaux supérieurs.

CONCLUSIONS.

Les résultats obtenus avec *B. subtilis* [7] et avec *B. megatherium* prouvent que le 2-3 butanediol et l'acétoïne ne sont pas nécessairement des produits terminaux inutilisables. Ils montrent également que leur utilisation ou leur non-utilisation ne sont pas

seulement des questions d'espèces ou de souches, mais aussi, et peut-être surtout, des questions de conditions physiologiques.

La production et l'utilisation de ces composés sont, en effet, étroitement liées au métabolisme de l'organisme. Tant que le milieu contient un glucide assimilable, si le développement microbien est entravé par une carence partielle d'oxygène ou d'azote, sans que la glycolyse soit inhibée, ces produits s'accumulent inutilisés dans le milieu, comme le sont les lipides dans certains cas dans d'autres organismes. Si l'oxygène et l'azote ni aucun autre facteur n'entravent le développement, ces produits ne se forment qu'en petites quantités.

Quand les glucides ont disparu, le 2-3 butanediol et l'acétoïne disparaissent à leur tour, dans tous les cas, sauf dans le cas d'une carence azotée où cette disparition est extrêmement lente.

Les expériences faites avec *B. megatherium*, dans un milieu où le 2-3 butanediol est le seul substrat carboné, prouvent que cette substance peut servir d'aliment à cet organisme.

L'on peut dire qu'au point de vue physiologique le butanediol et l'acétoïne constituent de véritables réserves comme les lipides, mais que ces réserves sont externes au lieu d'être intracellulaires.

Elles peuvent servir d'aliment carboné, soit à l'organisme qui les a formées, soit à d'autres organismes.

Elles peuvent ainsi jouer un rôle naturel important si, au lieu d'envisager le cas des cultures pures, on considère les phénomènes qui se produisent dans les milieux naturels où les diverses populations microbiennes se succèdent.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LEMOIGNE (M.). *Ces Annales*, 1913, 27, 856.
- [2] HERMANN (S.) et NEUSCHUL (P.). *Biochem. Z.*, 1932, 246, 446.
- [3] TOMIYASU (Y.). *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, 1938, 14, 53.
- [4] DOSY (E. A.) et WESTERFELD (W. W.). *J. Biol. Chem.*, 1943, 149, 229.
- [5] GREEN (D. E.), STUMPF (P. K.) et ZARUDNAYA (K.). *J. Biol. Chem.*, 1947, 167, 811.
- [6] LEMOIGNE (M.), PEAUD-LENOËL (C.) et CROSON (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1949, 229, 476.
- [7] LEMOIGNE (M.) et HOOREMAN (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, 227, 159.

ACCUMULATION DES SUBSTANCES DISSOUTES PAR LES CORPS MICROBIENS ETUDE QUANTITATIVE PAR POLAROGRAPHIE

I. — FIXATION DU BLEU DE MÉTHYLÈNE

par A. KEPES (*)

(Institut Pasteur. Service des Fermentations.)

L'accumulation par les microbes de substances dissoutes dans le milieu ambiant est, actuellement, un fait bien connu. Son importance a été bien soulignée par les études de trois ordres : les études de coloration [1, 2, 3], en particulier des colorations vitales, dont le nombre est très grand, quelques études systématiques sur des substances antiseptiques ou antibiotiques [4] et, enfin, quelques études faites sur les métabolites et les électrolytes habituels des milieux microbiens [5, 6]. Dans ces études, on retrouve les principaux facteurs dont dépend la fixation des substances : le pH en premier lieu [1, 2], une réaction alcaline favorisant la fixation des cations, une réaction acide, au contraire, accélérant la pénétration des anions. L'influence de la concentration en électrolytes a été reconnue au cours des techniques de coloration, l'influence de la concentration de la substance étudiée et du temps de contact n'a été qu'effleurée. Il paraissait évident qu'avec une plus forte concentration on obtient une fixation plus rapide.

Les théories qui ont vu jour au sujet de cette fixation des matières dissoutes sur les cellules sont elles-mêmes assez nombreuses, et il est difficile de choisir entre elles.

La théorie de la dissolution, où la fixation obéirait à une simple loi de coefficient de partage, n'est plus guère admise que pour les colorants des graisses.

Deux théories partagent actuellement les faveurs des biologistes : premièrement, la théorie de l'adsorption et, deuxièmement, la théorie d'une combinaison chimique plus ou moins stable. L'un ou l'autre des deux phénomènes peuvent d'ailleurs jouer

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 novembre 1949.

selon la substance en question. Stearn, M. Calla et Clark voient dans ces fixations surtout un phénomène d'échange d'ions qui serait stœchiométrique. Enfin, les botanistes surtout font allusion à un véritable travail actif de la cellule vivante, qui fonctionnerait comme « pompe osmotique » ayant un certain pouvoir d'accumulation.

Il nous a paru intéressant de reprendre cette question sur des bases quantitatives, et, surtout, de dégager les lois auxquelles obéissent ces accumulations, afin de voir s'il s'agit d'un seul et même phénomène pour les différentes substances avec simplement des données numériques différentes, ou bien, au contraire, si on peut distinguer des processus différents d'un cas à l'autre.

Nous avons pris le bleu de méthylène comme premier sujet d'étude, car son accumulation par les cellules nous a paru considérable.

Il n'est pas détruit par le métabolisme microbien, il est simplement réduit à l'état de leucodérivé. La fraction réduite est d'ailleurs relativement faible dans les conditions de nos expériences et on peut supposer, en première approximation, que la réduction n'altère pas sensiblement celles des propriétés du corps dont dépend sa fixation; en particulier, la grosseur moléculaire, le coefficient de diffusion et la charge électrique restent sensiblement constants.

D'autre part, le bleu de méthylène n'a pas une action toxique irréversible sur les corps microbiens. Comme l'ont montré Wood, Wood et Baldwin [7], il a simplement une action bactériostatique transitoire aux concentrations allant de 8 à 16×10^{-5} M, définitive aux concentrations plus élevées, mais seulement à l'état oxydé. Il a aussi une importance biologique certaine, non seulement en tant que colorant, mais aussi comme indicateur de potentiel d'oxydo-réduction.

Cette étude a été exécutée à l'aide d'un polarographe où un potentiomètre MECI sert d'instrument enregistreur. Il est connu que le bleu de méthylène donne un palier polarographique, avec un potentiel de demi-palier qui varie aux environs de 0 à 0,300 volts selon le pH. La forme de ce tracé polarographique a été étudiée par Brdicka [8] et ses collaborateurs, qui ont démontré que le palier polarographique peut être dédoublé, et que ce dédoublement est dû à l'adsorption du bleu de méthylène sur la surface de la goutte de Hg. Il est à signaler que le polarographe mesure simultanément le bleu de méthylène réduit (leucodérivé) qui se traduit par un courant négatif, et le bleu oxydé, dont le courant de diffusion est positif. La méthode polarographique a encore cet avantage qu'elle ne nécessite pas une centrifugation préalable pour mesurer la concentration du corps dissous et permet la mesure à peu près continue pendant plusieurs heures.

TECHNIQUE.

Des cultures de *B. megatherium* sur moût de bière gélosé sont recueillies vingt-quatre à quarante-huit heures après ensemencement. Dans les expériences relatées ici, l'absence de sporulation a été vérifiée au microscope. Les corps microbiens sont lavés dans l'eau bidistillée (500 cm³ environ par gramme de poids sec), centrifugés et remis en suspension dans l'eau bidistillée. Une partie aliquote de cette suspension est desséchée à l'étuve à 105-110° et pesée pour obtenir le poids sec.

Le bleu de méthylène utilisé est le bleu de méthylène pour bactériologie RAL, dont l'état de pureté n'a pas été vérifié. Une solution mère de bleu de méthylène filtrée est titrée par pesée après dessiccation d'un volume connu.

Les suspensions de *B. megatherium*, additionnées de bleu de méthylène, de tampon et d'une solution de KCl en quantité variable sont complétées à 20 cm³ et sont connectées au polarographe.

L'étalonnage du polarographe est fait avant et après une série d'expériences, par une solution de composition identique, mais sans microbes. Avant chaque mesure, l'oxygène dissous est chassé par barbotage d'azote purifié par passage sur copeaux de Cu chauffés au rouge.

Après chaque mesure de l'intensité du courant de diffusion, on déduit la concentration de bleu de méthylène restant en solution. Cette concentration multipliée par le volume donne la partie du bleu de méthylène initialement ajouté qui reste en solution, et, par différence, la quantité absorbée par les corps microbiens. Dans nos calculs, nous avons introduit une correction de volume pour tenir compte du volume occupé par les corps microbiens pris arbitrairement égal à cinq fois leur poids sec. Une modification de ce chiffre n'introduirait pas une grande variation dans les résultats. La quantité de colorant fixé par les microbes est rapportée au poids sec, et la concentration intramicrobienne ainsi exprimée est comparée à la concentration du colorant resté en solution. Dans les états d'équilibre, c'est, en effet, seules, ces deux concentrations qui interviennent, la quantité de corps initialement ajoutée, le volume de solvant et la quantité de germes ne jouent un rôle que dans la cinétique du phénomène.

Nous avons, en outre, vérifié que les conditions d'expérience n'altèrent pas la vitalité des germes. Des ensemencements après trois à cinq heures de contact avec le colorant et avec Hg ont donné des résultats positifs à la dilution de 10⁻⁷.

RÉSULTATS.

EXISTENCE D'UN ÉTAT D'ÉQUILIBRE ET RÉVERSIBILITÉ DU PHÉNOMÈNE. — L'expérience montre que les microbes mis en contact

avec le bleu de méthylène le fixent d'abord rapidement, puis de plus en plus lentement jusqu'à l'établissement d'un état d'équilibre. Nous caractériserons cet état d'équilibre par le rapport entre la concentration intramicrobienne et la concentration de la solution au moment de l'équilibre. C'est une quantité analogue à un coefficient de partage, sauf que la concentration intramicrobienne n'est pas rapportée au volume, mais au poids sec du microbe. Cependant, il ne préjuge pas de la nature du phénomène, car, dans l'hypothèse d'un phénomène d'adsorption de surface, il suffirait de l'affecter par un coefficient constant, en supposant uniforme la taille des microbes, pour avoir la concentration superficielle en fonction de la concentration de la solution.

Dans l'ensemble de nos résultats, les quotients $\frac{C. \text{ bact.}}{C. \text{ sol.}}$ se situent entre 100 et 700. C'est dire que pour une concentration de substance en solution de 1 p. 1.000, la même substance sera présente dans les corps microbiens dans la proportion de 10 à 70 p. 100 de leur poids sec. Cependant, pour parler d'équilibre, il ne suffit pas de constater que la fixation tend vers une limite, il faut encore qu'elle soit réversible. Dans une suspension dont l'état limite est atteint et mesuré, ajoutons une quantité de solvant de façon à doubler le volume. A l'instant du mélange, C. sol. est réduite de 50 p. 100, alors que C. bact. n'a pas varié, et le rapport $\frac{C. \text{ bact.}}{C. \text{ sol.}}$ se trouve perturbé à l'avantage des corps microbiens. On observe alors un dégagement de colorant jusqu'à l'établissement d'un nouvel état d'équilibre. Deux faits sont remarquables :

1° Le dégagement du colorant fixé est un phénomène beaucoup plus rapide que sa fixation.

2° Le nouvel équilibre atteint est caractérisé par un rapport $\frac{C. \text{ bact.}}{C. \text{ sol.}}$ identique au précédent. Ce phénomène, répété plusieurs fois, est décrit numériquement dans le tableau I et représenté figure 1.

Expérience du 10 juin 1949 :

<i>B. megatherium</i> , culture de 24 h. . .	5 cm ³ , soit 0,335 g. sec.
Bleu de méthylène à 1,7 p. 100 . . .	4 cm ³ , soit 0,068 g.
KCl à 30 p. 100.	1 cm ³ , soit 1,5 p. 100.
Tampon phosphate pH 6,8 M/15. . . .	5 cm ³ , soit M/60.
Complété à.	20 cm ³ .

Dilutions successives par une solution de KCl à 1,5 p. 100; M/60 en tampon phosphate. (*Lignes 2 et suivantes du tableau I.*)

La constance du rapport $\frac{C. \text{ bact.}}{C. \text{ sol.}}$ est donc vérifiée avec une

TABLEAU I.

B. M. TOTAL (mg.)	KCl (p 100)	pH	VOLUME (cm ³)	VOLUME corrigé cm ³	C. SOL. (mg./cm ³)	B. M. SOL. (mg.)	B. M. BACT. (mg.)	C. BACT. (mg./g.)	C. BACT. C. SOL.
68	0	6,8	19	17,33	0,24	4,15	63,8	190	790
68	1,5	6,8	20	18,33	0,88	16,2	51,8	155	176
68	1,5	6,8	40	38,3	0,667	25,5	42,5	127	192
68	1,5	6,8	80	78,3	0,483	37,8	30,2	90	186
68	1,5	6,8	122,8	121	0,382	41,6	21,9	65,5	172
68	1,5	6,8	245,6	244	8,225	53,7	14,3	42,7	194

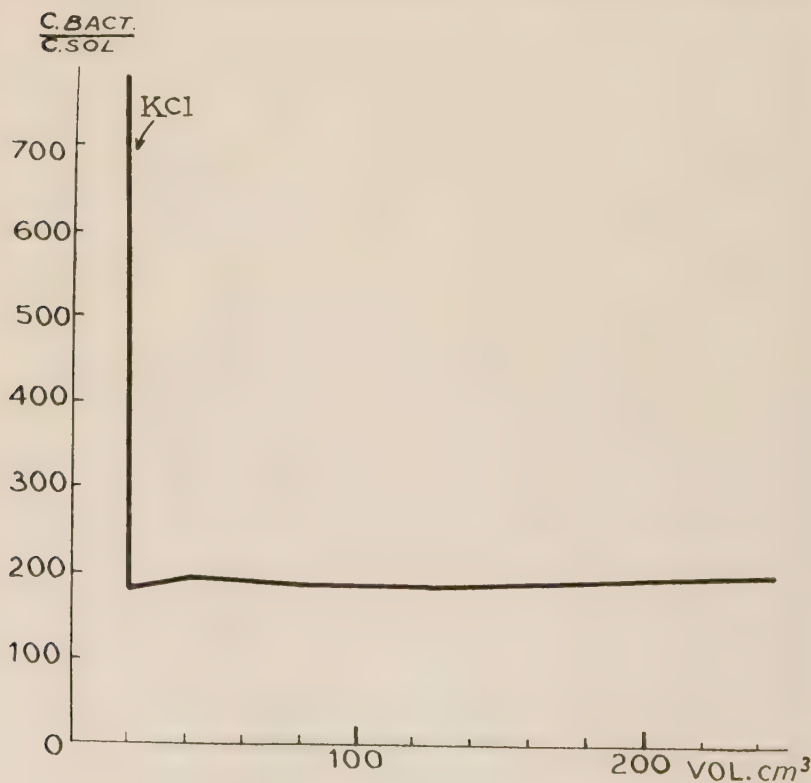


FIG. 1.

très bonne approximation, tout au moins dans le domaine où les concentrations intramicrobiennes varient de 4 à 15 p. 100 du poids sec.

La même expérience sur *E. coli* a donné des résultats ana-

logues, quoique les chiffres du rapport $\frac{C. \text{ bact.}}{C. \text{ sol.}}$ oscillent d'avantage et de façon irrégulière entre 145 et 255 pour des concentrations intramicrobiennes allant de 9 à 31 p. 100 du poids sec.

Nous n'avons pas pu, jusqu'à présent, obtenir les limites réelles du domaine où cette proportionnalité reste valable, car pour mesurer les concentrations très faibles notre polarographe n'était pas muni d'un système de compensation de courant résiduel suffisamment précis, et pour les fortes concentrations de bleu de méthylène on observe fréquemment une floculation des microbes, ce qui trouble le phénomène, ou rend tout au moins le temps d'équilibre très long. Cependant, dans une expérience, nous avons obtenu les chiffres très élevés du tableau II.

TABLEAU II.

B. M. TOTAL	POIDS SEC	VOLUME	VOLUME corrigé	C. SOL.	B. M. SOL.	B. M. BACT.	C. BACT.	$\frac{C. \text{ BACT.}}{C. \text{ SOL.}}$
180	114,4	20	19,4	2,94	57	123	1.080	369

D'après cette expérience, les microbes sont capables de fixer un poids de bleu de méthylène supérieur à leur poids sec. Et dans cette expérience, nous n'avons probablement pas atteint l'état d'équilibre car les mêmes microbes dans les mêmes conditions de concentration électrolytique et de pH ont donné, pour des concentrations plus basses en bleu de méthylène, un rapport $\frac{C. \text{ bact.}}{C. \text{ sol.}} = 745$. D'autre part, dans cette expérience la concentration finale du bleu de méthylène en solution n'atteint pas 3 p. 1.000 et on peut réaliser des concentrations bien plus fortes.

ACCUMULATION EN FONCTION DU TEMPS. — Dans sept expériences nous avons suivi la concentration de la substance dissoute en présence d'une suspension microbienne d'une façon quasi continue pendant soixante à cent quatre-vingts minutes. Une de ces expériences est relatée dans le tableau III et représentée figure 2.

Expérience du 7 juin 1949 :

B. megatherium, culture de 64 h. sur gélose. 4 cm³, soit 142,5 mg. sec.
 Bleu de méthylène 1,70 p. 100 2 cm³, soit 34 mg.
 KCl, solution à 30 p. 100. 4 cm³, soit 6 p. 100.
 Tampon phosphate M/15 pH 6,8. 10 cm³, soit M/30.
 Dilution par une solution contenant 6 p. 100 KCl et M/30 phosphate, pH 6,8.

TABLEAU III.

B. M. TOTAL	VOLUME corrigé	C. SOL.	B. M. SOL.	B. M. BACT.	C. BACT.	$\frac{C. BACT.}{C. SOL.}$	TEMPS MIN.
34	19,3	1,76	34	0	0	0	0
		1,46	28,9	3,8	40,8	28	3
		1,28	24,1	9,3	65,3	51	10
		0,87	16,9	17,2	121	139	20
		0,69	13,3	20,7	145	210	30
		0,55	10,6	23,4	165	300	45
		0,478	9,2	24,8	175	366	60
34	39,3	0,239	9,2	24,8	175	135	60 *
		0,29	11,4	22,6	158	545	70
		0,31	12,2	21,8	153,5	495	80
		0,34	12,2	21,8	153,5	495	105

Les lignes marquées d'un * sont calculées par hypothèse.

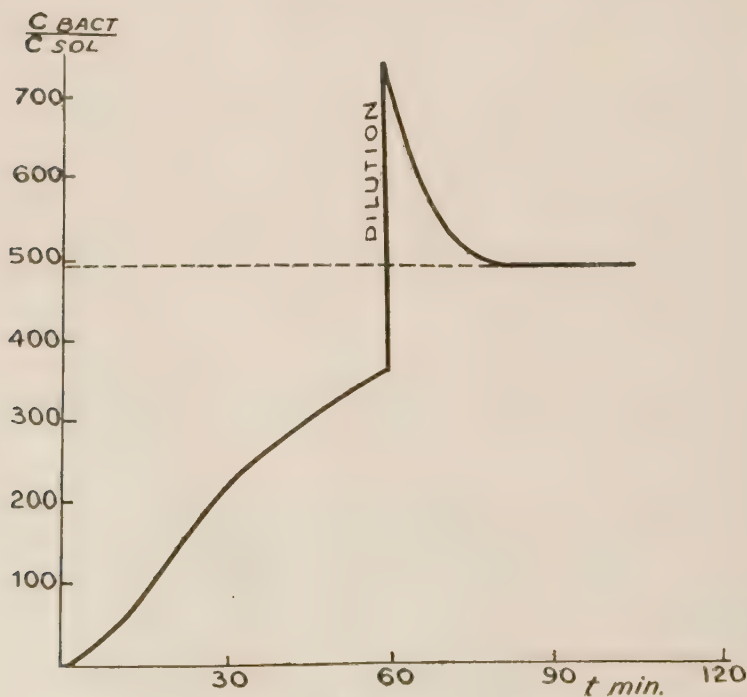


FIG. 2

La courbe représente l'évolution du quotient $\frac{C. \text{ bact.}}{C. \text{ sol.}}$ en fonc-

tion du temps dans la même expérience. On voit que la courbe a une allure exponentielle. Le temps requis pour que la moitié de la quantité d'équilibre soit fixée est de trente-cinq minutes dans le cas actuel, alors que le phénomène inverse a une constante de temps voisine de cinq minutes. On ne peut attribuer qu'une valeur de grossière approximation à ce dernier chiffre, car le phénomène est si rapide qu'il est pratiquement impossible de le saisir dans des conditions favorables. Il faudrait, en effet, pour régulariser l'allure de ce dégagement, une agitation continue, mais les mesures ne sont possibles qu'en l'absence d'agitation, et l'appareil a une inertie telle qu'il faut au moins une minute pour faire une mesure valable. Les mêmes difficultés se rencontrent aux premières minutes des courbes de fixation, surtout quand le phénomène est plus rapide que dans le cas cité, ce qui est le cas le plus fréquent. Cependant, la dissymétrie des constantes de temps de l'accumulation et du dégagement est significative et se conçoit aisément devant l'immense dissymétrie des concentrations de part et d'autre de la membrane microbienne.

Malgré les imperfections des courbes dues aux difficultés signalées plus haut, l'allure générale de ces courbes est caractéristique et répond dans l'ensemble à l'équation :

$$C. \text{ bact.} = C. \text{ bact.} (1 - e^{-Bt}) \\ t = \infty$$

qui résulte de la seule hypothèse que la vitesse de pénétration du corps dissous est proportionnelle à chaque instant à l'éloignement où se trouve le système de son état d'équilibre.

Dans l'équation ci-dessus, B est une constante de temps qui pourrait servir, en tenant compte des concentrations initiale et finale du volume et de la force ionique du solvant, à définir une caractéristique microbienne d'« avidité » ou de « perméabilité ». Dans nos expériences, cette caractéristique varie d'une façon imprévue et cette question demande encore une étude plus approfondie.

ACCUMULATION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ÉLECTROLYTES DU MILIEU. — Une forte concentration en électrolytes diminue l'accumulation du colorant alors qu'une faible concentration la favorise. Il nous a semblé inutile de faire cette expérimentation en deux phases, comme McCalla, qui met d'abord en contact la suspension avec une substance pour en observer le déplacement après équilibre par une seconde substance. Il nous est apparu, en effet, dès le début, qu'il s'agissait d'états d'équilibres réversibles dont le niveau définitif ne dépendait pas de l'ordre dans lequel les composants ont été ajoutés. Ceci devient clair à la comparaison des lignes 1 et 2 du tableau I où on

voit que l'adjonction de 1,5 p. 100 de KCl diminue considérablement la quantité de colorant accumulée par les corps microbiens en l'absence de KCl.

Expérience du 20 septembre 1949 :

B. megatherium, culture de 22 h., lavé et mis en suspension dans l'eau distillée.

Suspension 2 cm³, soit 106 mg. sec.

Bleu de méthylène 0,5 cm³, soit 15 mg.

Tampon Sørensen pH 6,8 5 cm³, soit M/60.

KCl concentration finale De 0 à 10 p. 100.

Eau Q. S. 20 cm³

Mesures faites à partir de 1 h. 30 du moment du mélange.

TABLEAU IV.

B. M. TOTAL (mg.)	VOLUME corrige	C. SOL.	B. M. SOL.	B. M. BACT.	C. BACT.	C. BACT. C. SOL.	KCl (p. 100)
15	19,5	0,173	3,37	11,63	109,5	603	0
		0,264	5,15	9,85	92,5	350	0,5
		0,375	7,3	7,7	72,5	193	1
		0,44	8,6	5,4	60,2	137	2
		0,50	9,75	5,25	49,5	99	5
		0,527	10,25	4,75	44,5	84,5	10
		0,212	4,13	10,97	103,2	487	0,25

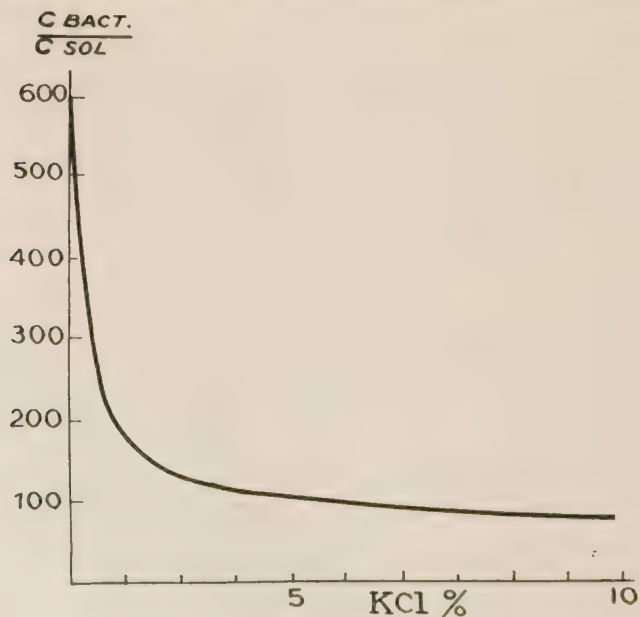


FIG. 3.

Deux étalonnages ont été faits avec du bleu de méthylène en présence de 1 p. 100 et de 5 p. 100 de KCl pour diminuer les erreurs polarographiques dues aux changements de conductivité du liquide.

Les résultats consignés dans le tableau IV sont représentés figure 3 où le rapport $\frac{C. \text{ bact.}}{C. \text{ sol.}}$ est porté en fonction de la concentration en KCl.

La courbe descend rapidement entre 0 p. 100 et 1 p. 100 de KCl, plus lentement ensuite. Sans aucun doute, il ne s'agit pas d'un déplacement quantitatif du cation bleu de méthylène par K, mais la courbe pourrait plutôt se comparer à celle qui représente le potentiel électrokinétique (ξ) des molécules de protéine en fonction de la force ionique.

VARIATION DE LA FIXATION DU BLEU DE MÉTHYLÈNE AVEC LE pH.
— Il est connu que les colorants basiques se fixent sur les corps microbiens d'autant plus facilement que le pH du milieu est lui-même plus alcalin. Il est connu également, et les travaux de Stearn et Stearn ont approfondi la question, que la fixation du colorant devient importante surtout à des pH supérieurs à la zone isoélectrique des microbes et on peut distinguer, à cet égard, très nettement entre les germes Gram-négatifs et Gram-positifs. Les germes ne gardant pas le Gram ont, en effet, leur zone isoélectrique entre pH 5 et 6, alors que les Gram-positifs l'ont entre 2 et 3. Nos résultats concordent avec ces faits en les précisant numériquement. Ils sont résumés dans le tableau V et sont représentés figure 4 (A) pour *B. megatherium*, Gram-positif, et figure 4 (B) pour *E. coli*, Gram-négatif. Le phénomène n'a pas les caractères d'un simple virage qui passe de la non-fixation à travers quelques échelons à la fixation maxima dans la zone isoélectrique du microbe, mais la quantité fixée augmente de plus en plus avec le pH et tend vers un deuxième palier entre pH 8 et 9 correspondant vraisemblablement à la constante de dissociation du bleu de méthylène. Dans cette zone il y a, en outre, une hydrolyse appréciable du microbe et il est possible que le bleu de méthylène forme des complexes avec quelques produits de l'hydrolyse.

A part la différence d'allure des deux courbes, on remarquera que dans la zone des pH neutres, à conditions égales, *E. coli* a des coefficients d'adsorption trois à quatre fois supérieurs à ceux du *B. megatherium*. S'il s'agit d'une adsorption de surface, ce phénomène s'explique aisément par la taille beaucoup plus petite de *E. coli*. Mais il s'explique également dans le cas de la fixation du colorant sur les protéines par la forte teneur de *B. megatherium* en corps non protéiques.

TABLEAU V.

B. M. TOTAL	MICROBES poids sec	KCl (p. 100)	TAMPON		VOLUME corrige	C SOL.	B. M. SOL.	B. M. BACT.	C. BACT.	C. BACT. C. SOL	pH reel
			pH	Mol.							
<i>B. megatherium.</i>											
30	98	2	4 4,5 5,5 6,5 7 7,5 8	1/60	19,5	1,275	25	5	51	40	3,4
						1,17	22,8	7,2	73,5	63	3,5
						1,01	19,7	10,3	105	104	5,2
						0,885	18,2	11,8	120	136	6,45
						0,75	15,4	14,6	148	197	6,8
						0,627	12,9	17,1	174	218	7,3
						0,575	11,8	18,2	185	322	7,6
15,2	132	6	NaOH	q. s.		0,228	4,47	10,73	81	355	8
<i>E. coli.</i>											
12	36	2	2,5 3,5 4,5 6	1/20	19,8	0,587	11,62	0,38	10,6	18,4	2,6
						0,583	11,56	0,44	12,2	21	3,1
						0,573	11,36	0,64	17,8	31	4,3
						0,35	6,92	5,08	141	402	5,7
15	83	2,5	4 5 6 7 8	1/60	15,6	0,510	7,95	7,05	85	162	5,1
						0,402	6,23	8,75	105	262	5,5
						0,300	4,68	10,32	124	413	6,1
						0,218	3,4	11,6	140	640	7,2
						0,188	2,93	12,07	145	770	8,6

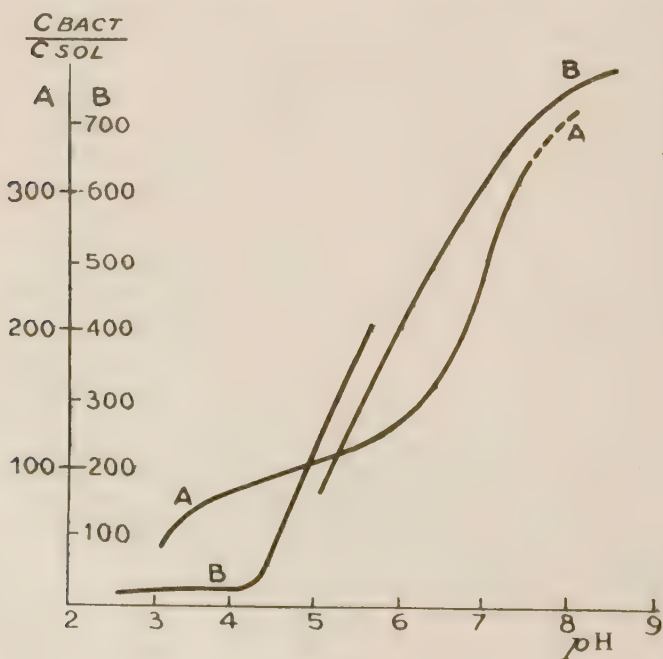


FIG. 4

DISCUSSION.

Dans la méthode polarographique et dans les conditions de notre travail, l'ordre de précision de chaque mesure prise isolément est de 3 à 5 p. 100. Dans les chiffres obtenus par différence qui servent de base à nos calculs, les erreurs peuvent être, dans certains cas, bien plus considérables. Cependant la précision relative de deux mesures voisines est très bonne et on peut affirmer que l'allure des phénomènes est bien celle représentée par nos courbes. Par contre, dans les mesures isolées, comme celle du tableau II, l'erreur peut être considérable et il ne faut en retenir que l'ordre de grandeur. Quant à la nature du phénomène observé, notre étude ne permet pas encore de trancher entre les diverses hypothèses. En particulier l'hypothèse de la dissolution avec un coefficient de partage variable selon les conditions ioniques, ou l'hypothèse de l'adsorption si l'on suppose être loin de la saturation des surfaces dans le domaine que couvre notre expérience du tableau I, figure 1, sont également possibles.

Cependant, les variations de la fixation en fonction de la composition ionique du milieu (pH et force ionique) qui se font toujours dans le même sens que les variations du potentiel des molécules protéiques tendraient à prouver que la charge électrique joue un rôle des plus importants et qu'il s'agirait d'un phénomène électro-capillaire. La question reste toujours en suspens, à savoir : si l'adsorption a lieu à la surface microbienne ou bien sur les molécules de protéines microbiennes situées aussi bien à la surface qu'à l'intérieur des microbes. Le rôle que jouerait dans ce phénomène l'abaissement de tension superficielle dû au corps en solution ne pourrait être précisé que par la comparaison critique de l'adsorption d'un certain nombre de corps différents, car la surface liquide-microbe n'est pas directement accessible à l'expérience, si tant est qu'elle puisse être considérée comme une interface.

Une expérimentation ultérieure devrait également décider si l'étude de l'adsorption en fonction du temps peut fournir une caractéristique microbienne de quelque valeur.

CONCLUSIONS.

Il ressort de cette étude que :

1° Les substances dissoutes peuvent s'*accumuler considérablement* dans les corps microbiens et il y a lieu d'en tenir le plus grand compte, surtout dans les expériences où ces substances sont introduites comme simples indicateurs. C'est la cause de la discordance entre les études colorimétriques et les études élec-

trométriques sur le potentiel d'oxydo-réduction limite des cultures microbiennes que nous avons signalée [9].

2° Ce phénomène d'accumulation tend vers un état *d'équilibre réversible* qui est atteint beaucoup plus rapidement par élution que par accumulation.

3° Le niveau de cet équilibre varie pour l'adsorption d'une cation comme le bleu de méthylène dans le même sens que la charge électrique négative des microbes quand on fait varier le pH et la concentration électrolytique du milieu.

4° La méthode polarographique est particulièrement appropriée à ce genre de mesures car elle n'exige pas la séparation préalable des corps microbiens et du liquide ambiant. Elle permet, en outre, des mesures quasi continues.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LASSEUR (Ph.), DUPAIX (A.) et GEORGES (L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1933, **196**, 1749.
- [2] STEARN (A. E.) et STEARN (E. W.). *J. Bact.*, 1924, **9**, 463.
- [3] STEARN (A. E.) et STEARN (E. W.). *J. Bact.*, 1924, **9**, 479.
- [4] STEARN (A. E.) et STEARN (E. W.). *J. exp. Med.*, 1930, **51**, 341.
- [5] McCALLA (T. M.). *J. Bact.*, 1940, **40**, 23.
- [6] McCALLA (T. M.). *J. Bact.*, 1941, **41**, 775.
- [7] WOOD (W. B.), WOOD (M. L. jr) et BALDWIN (I. L.). *J. Bact.*, 1935, **30**, 593.
- [8] BRDICKA (R.). *Coll. Trav. Chim. Tchécosl.*, 1947, **12**, 522.
- [9] KEPES (A.) et LEMOIGNE (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **225**, 1556.

M. Dervichian : Les résultats présentés par M. Kepes sont du plus grand intérêt. Il s'agit non pas simplement, comme on pourrait le croire, de la question de la fixation des colorants par les bactéries, mais du problème très général de l'action des composés organiques ionisés sur les microorganismes. Pour comprendre l'importance de ce problème, il suffit de se rappeler que la plupart des agents antibiotiques sont des composés organiques ionisés, qu'un très grand nombre d'entre eux sont des électrolytes colloïdaux comme le sont les colorants. En examinant les courbes des figures de la communication de M. Kepes, on est frappé de la similitude que présente la fixation des colorants par les bactéries avec la fixation des colorants par les protéines. Il semblerait donc que ce soient les constituants protéiques des bactéries qui réagissent avec les colorants.

M. Tabone : L'étude du mécanisme de l'action des antibiotiques pourrait-elle bénéficier des avantages que semble présenter cette méthode d'analyse ? Pour ne citer qu'un exemple, pourrait-on étudier la « fixation » des sulfamides sur une bactérie avant et après qu'elle ait été rendue sulfamido-résistante ?

M. Wahl demande si on a quelques notions sur la nature de cette « fixation » de certaines substances par les bactéries ; par exemple, s'il s'agit d'un phénomène de surface, de combinaisons avec certains groupe-

ments, etc. Il propose de tenter d'obtenir des renseignements à ce sujet :

a) En recherchant si cette « fixation » modifie les constantes électrophorétiques des bactéries.

b) En comparant les courbes de fixation sur les bactéries vivantes et sur les bactéries tuées par la chaleur et par divers antiseptiques.

ACTION DU BACTÉRIOPHAGE SUR LA TOXICITÉ DES CULTURES JEUNES DU *CL. PERFRINGENS* TYPE A

par A. GUELIN et A. KRÉGUER.

(Institut Pasteur, Service du Bactériophage
et Service des Toxines gangréneuses.)

Les recherches sur le rapport existant entre le bactériophage et les toxines bactériennes sont très limitées et ne touchent guère que les toxines des germes aérobies, notamment celles des bacilles diphtériques, dysentériques, des staphylocoques et de *Pasteurella pseudotuberculosis* (Blair 1924, Larkum 1932-1933, Stone et Hobby 1934, Fejgin et Kuhn 1936, Lazarus et Nozawa 1947).

Dans ce travail, nous avons étudié l'influence du bactériophage sur la production de la toxine par des cultures jeunes de *CL. perfringens* type A et nous avons constaté que la contamination par le bactériophage n'atteint pas d'une façon appréciable le pouvoir toxinogène des souches.

Pour ces études, deux possibilités d'expériences se présentaient : 1° la contamination d'une culture dès le départ de sa croissance, en évitant les quantités de bactériophage susceptibles de provoquer une lyse rapide et, 2° la désintégration d'une culture, préalablement développée dans des conditions normales, par l'introduction de doses massives de bactériophage.

Dans le premier cas, la contamination de la culture est effectuée au début de son développement avec de petites quantités de filtrat bactériophagique. Les bactéries continuent à se développer en présence du phage dont le titre augmente aussi. Dans une telle culture, les éléments bactériens présenteront probablement les états les plus divers. A côté des cellules exemples de bactériophage et se multipliant normalement, on peut prévoir la formation des mutants résistant au phage. Il est possible que certaines bactéries déjà insensibles au bactériophage se trouvent dans les meilleures conditions de leur développement à la suite de l'invasion d'une partie des cellules par les corpuscules en formation. Enfin, on peut supposer que la plus grande partie des bactéries, ayant fixé le bactériophage en quantité différente, continuerait à se développer jusqu'à un certain moment. L'important est de savoir

quelle répercussion aura la présence du bactériophage sur la production de la toxine par la souche de *Cl. perfringens*.

Dans le deuxième cas, la culture se développera normalement sans bactériophage et la production de la toxine suivra son cours habituel. Ensuite, les cellules seront rapidement désintégrées sous l'action des doses massives du bactériophage introduit. Cette désintégration cellulaire s'accompagnera-t-elle d'une élévation de la teneur du milieu en toxine ?

TECHNIQUE ET RÉSULTATS.

La culture de *Cl. perfringens* se développe généralement très vite, et au bout de trois-quatre heures, elle est déjà abondante. Toutes nos expériences ont été faites pendant les six premières heures du développement, car le bactériophage *perfringens* atteint son titre maximum en l'espace de deux heures ; passé ce délai, le titre peut baisser. En prolongeant la durée de l'expérience, nous risquons de voir apparaître une culture secondaire, insensible à l'action du bactériophage. D'autre part, la lyse massive des bactéries dans une culture âgée ne se réalise pas.

Le bactériophage *perfringens* 80 b, utilisé dans ces recherches, est actif sur une souche (80 b) de *Cl. perfringens*, type A, provenant de la collection de M. Weinberg. Cette souche élabore de la toxine en bouillon Vf glucosé : la dose minima mortelle des cultures centrifugées vingt-quatre heures après l'ensemencement est, en général, de 0,1 à 0,05 cm³, et la dose minima hémolytique varie entre 0,001 et 0,0005 cm³.

Les pouvoirs toxique et hémolytique peuvent être décelés au cours des premières heures de son développement.

En présence de cette souche, le titre du bactériophage augmente facilement, mais la lyse complète des bactéries dans les milieux liquides n'a lieu que très rarement. Les plages formées sur milieux solides sont d'une taille moyenne, qui, d'ailleurs, varie beaucoup suivant la vitesse de la croissance bactérienne. Le champ d'action du bactériophage est assez large : sur 5 souches étudiées, il en attaque 4. Par contre, la souche 80 b elle-même ne possède qu'une réceptivité limitée vis-à-vis d'autres phages *perfringens*. Parmi les 5 bactériophages (T, M, 80 b, Am 8 et Weinberg), seul le phage 80 b est actif sur elle.

Les bactériophages avec lesquels la souche a été éprouvée ont été isolés, dans notre laboratoire, par M^{lle} Le Bris (1), à qui nous adressons nos vifs remerciements.

Pour la réalisation d'une partie de ce travail, il nous a été nécessaire de recourir à une installation spéciale. Nous remer-

(1) Du Centre d'Etudes Hydrobiologiques du C. N. R. S.

cions très sincèrement M^{lle} Guillaumie de l'aide qu'elle nous a apportée avec son obligeance coutumière.

TOXICITÉ DES CULTURES DE *Cl. perfringens* DÉVELOPPÉES EN PRÉSENCE DE BACTÉRIOPHAGE. — Les expériences ont été réalisées facilement, car la souche 80 b continue à se développer, même en présence de quantités considérables de bactériophage. Il fallait donc vérifier si son pouvoir toxigène reste intact dans de telles cultures.

Pour les expériences, la culture contaminée par le bactériophage et la culture témoin non contaminée doivent nécessairement avoir la même quantité de germes. Il est à prévoir qu'après les mêmes délais, la toxicité d'une culture qui s'est développée lentement n'est pas comparable à la toxicité d'une culture dont la multiplication a été intense. C'est pourquoi, au cours des expériences, la quantité de bactéries a toujours été contrôlée à l'aide d'une cellule compte-bactéries de Salimbeni. Cette méthode donne de très bons résultats et elle est facilement applicable à cause de la taille considérable des bâtonnets du *Cl. perfringens*. La numération des colonies obtenues dans la gélose profonde s'est révélée assez satisfaisante, à condition d'employer de la gélose à base de bouillon non glucosé. Toutefois, le nombre des germes obtenus par ce moyen est toujours inférieur à celui que l'on obtient par numération avec la cellule, même au cours des stades précoces de la culture. Les numérations des colonies obtenues à la surface de la gélose, en utilisant l'étuve à vide, ont donné des chiffres très inférieurs et contradictoires.

Nous donnerons ici le protocole et les résultats de deux expériences concernant l'étude de la toxicité des cultures développées en présence de bactériophage.

TECHNIQUE. — Ensemencement de 30 cm³ de bouillon Vf avec une culture de quatre heures. Etuve à 36° C. Au bout de quelque temps, la turbidité de la culture est comparée avec une dilution standard formolée. Ensuite, elle est divisée en deux parties et les bactéries sont comptées. Une partie de la culture est inoculée avec le bactériophage. Dans l'autre, qui sert de témoin, on introduit la même quantité de bouillon. Bain-marie à 36° C. Numération des bactéries dans les deux cultures durant toute l'expérience. Refroidissement et centrifugation. Titrage du bactériophage (par la méthode des dilutions sur les milieux solides), de la toxine (souris blanches, injections intraveineuses) et du pouvoir hémolytique (en présence des globules rouges de mouton et d'eau physiologique). Les résultats figurent dans les tableaux 1 et 2.

Dans toutes les expériences, malgré la contamination de la souche 80 b par son bactériophage, les bactéries continuent à se

TABLEAU I. — Résultats des titrages d'une culture toxique de *Cl. Welchii* développée en présence du bactériophage actif.

TEMPS EN MINUTES	QUANTITÉ de bactéries par centimètre cube		QUANTITÉ de bactériophages par centimètre cube	POUVOIRS TOXIQUE ET HÉMOLYTIQUE
	Expérience (avec bactériophage)	Témoin (sans bactériophage)		
Départ.	$4,8 \cdot 10^7$	$4,8 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^5$	<i>D. M. M.</i> : Exp. — $> 0,5$; Témoin — $> 0,5$. <i>D. M. H.</i> : Exp. — 0,6; Témoin — 0,6.
30	$9,2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^8$	0	
60	$1,2 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^6$	<i>D. M. M.</i> : Exp. — 0,4; Témoin — 0,25 à 0,4. <i>D. M. H.</i> : Exp — 0,005; Témoin — 0,009.
90	$2,2 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^7$	
120	$6,4 \cdot 10^8$	$4,8 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^7$	

TABLEAU II. — Résultats des titrages d'une culture toxique de *Cl. Welchii* développée en présence du bactériophage actif.

TEMPS EN MINUTES	QUANTITÉ de bactéries par centimètre cube		QUANTITÉ de bactériophages par centimètre cube	POUVOIRS TOXIQUE ET HÉMOLYTIQUE
	Expérience (avec bactériophage)	Témoin (sans bactériophage)		
Départ.	$1,6 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^7$	<i>D. M. M.</i> : Exp. — 0,4; Témoin — 0,25. <i>D. M. H.</i> : Exp. — 0,001; Témoin — 0,0009.
30	$6,8 \cdot 10^7$	$8,8 \cdot 10^7$		
60	$1,2 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$		
90	$2,1 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	
120	$5,2 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$	$8,4 \cdot 10^7$	
150	$5,2 \cdot 10^8$	$4,8 \cdot 10^8$	$5,3 \cdot 10^8$	
180	$7,6 \cdot 10^8$	$6,8 \cdot 10^8$	$4,8 \cdot 10^8$	
210	$1,1 \cdot 10^9$	$8,8 \cdot 10^8$	$3,7 \cdot 10^8$	
255	$1 \cdot 10^9$	$7,6 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$	

multiplier à peu près de la même façon que chez le témoin. S'il arrive que leur développement soit un peu retardé au début, ensuite, au cours de la multiplication, le taux des bactéries devient égal et parfois même légèrement supérieur à celui du témoin.

Le titrage de la toxine et du pouvoir hémolytique dans une telle culture ne révèle jamais de différence sensible avec la culture non contaminée. Comme on le constate dans le tableau II, la dose minima mortelle de culture traitée par le bactériophage est même supérieure à son témoin. Cette différence peut être expliquée par la quantité légèrement plus grande des bactéries dans la culture contaminée.

Dans certains cas, l'égalité relative de la quantité des germes dans la culture contaminée et son témoin peut être mise au compte de l'augmentation insignifiante du bactériophage. Par contre, dans d'autres expériences, où le bactériophage s'accroît considérablement, ni la multiplication bactérienne, ni la toxicité de la culture ne semblent être inhibées. Voici les résultats d'une telle expérience après quatre heures :

	CULTURE + BACTÉRIOPHAGE	TÉMOIN
1° Quantité de bactériophage par centimètre cube	3,4.10 ¹⁰ ; (au départ — 1,8.10 ⁷)	—
2° Quantité de bactéries par centimètre cube	3,4.10 ⁸ ;	— 3,5.10 ⁸
3° Dose minima mortelle.	0,25 cm ³ ;	— 0,5 à 0,25 cm ³
4° Dose minima hémolytique	0,001 cm ³ ;	— 0,001 cm ³

Au cours de ces expériences, nous n'avons observé aucun rapport entre la formation du bactériophage et la production de la toxine. On peut avoir des centrifugats dont la toxicité est presque nulle, mais dont le titre bactériophagique est fort élevé. La possibilité de neutralisation de la toxine par le bactériophage semble être exclue de nos expériences : la toxicité de la culture contenant le bactériophage est trop proche de celle de la culture témoin pour qu'on puisse admettre une inactivation notable.

1° TOXICITÉ DES CULTURES DE *Cl. perfringens* DÉVELOPPÉES NORMALEMENT ET LYSÉES ENSUITE PAR LE BACTÉRIOPHAGE INTRODUIT.

Comme nous l'avons déjà indiqué, la lyse totale de *Cl. perfringens* 80 b par son bactériophage est rarement observée dans les milieux liquides. Il fallait chercher un moyen pour accélérer le phénomène de la bactériophagie, pour avoir la désintégration rapide des cellules. Des essais de brusques changements de température ont donné des résultats satisfaisants. La culture, après s'être développée normalement, est additionnée de filtrat bactériophagique et transportée alternativement, soit à 37°, soit à 2°, jusqu'à son éclaircissement. Une de ces expériences est reproduite ici.

TECHNIQUE. — La culture de six heures du *Cl. perfringens* 80 b est refroidie dans l'eau glacée à 2° C et divisée en trois

parties. Une partie est additionnée de filtrat bactériophagique à I:I; l'autre partie, qui servira de témoin pour les titrages, est diluée (I:I) avec du bouillon; la troisième partie, également diluée et formolée, servira pour la comparaison de la densité bactérienne pendant l'expérience. La culture contaminée avec le bactériophage est plongée dans le bain-marie à 37° C pendant dix minutes. Refroidissement à 2° C pendant une demi-heure. La densité de la culture est toujours comparée avec le témoin formolé. Dès le deuxième séjour à 37° C, la culture commence à s'éclaircir rapidement; elle est gardée ensuite dans l'eau glacée. Numération des bactéries. Centrifugation. Titrage de la toxine, du pouvoir hémolytique et du bactériophage. Voici les résultats d'une de nos expériences :

	CULTURE + BACTÉRIOPHAGE —	TÉMOIN —
1° Quantité de bactériophage par centimètre cube . .	7,2.10 ⁹ après la lyse;	(1.10 ⁹ avant la lyse.)
2° Quantité de bactéries par centimètre cube	3.10 ⁶ ;	4,4.10 ⁸
3° Dose minima mortelle . .	0,5 à 0,25 cm ³ ;	0,5 à 0,25 cm ³
4° Dose minima hémolytique	0,003 cm ³ ;	0,003 cm ³

Le filtrat bactériophagique ajouté à la culture pour provoquer la dissolution des bactéries a été préparé avec la souche 80 b. Son titre bactériophagique est de 2,4 10⁹; la dose minima mortelle est de 0,5 à 0,25 cm³; la dose minima hémolytique, 0,03 cm³.

Ces résultats, confirmés par un certain nombre d'autres, permettent de conclure que la quantité de toxine dans une culture très jeune de *Cl. perfringens* ne subit pas d'augmentation, du fait de la désintégration des cellules bactériennes par le bactériophage 80 b.

RÉSUMÉ. — Nous avons étudié l'action du bactériophage sur la production de la toxine par la culture de *Cl. perfringens* type A, au cours des six premières heures de son développement.

La production de la toxine par une culture se développant en présence de bactériophage suit son cours habituel, malgré l'augmentation du titre bactériophagique.

Le nombre des bactéries, dans une telle culture, est sensiblement égal à celui d'une culture non infectée.

La désintégration par le bactériophage d'une culture se développant normalement ne s'accompagne pas d'une augmentation de la quantité de toxine.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 2 Février 1950.

Présidence de M. MAGROU.

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Lépine : J'ai l'honneur de présenter à la Société au nom de MM. Morin, Nehlil et Pichon, le livre récemment paru qu'ils ont consacré à la streptomycine (1).

La streptomycinothérapie est de date récente : néanmoins elle a suscité déjà un tel nombre de travaux originaux qu'il est pratiquement impossible au chercheur, comme au clinicien, de se tenir au courant de l'ensemble des publications ayant trait à la streptomycine, d'où achèvent actuellement de se dégager les indications de ce nouvel antibiotique. Les auteurs ont non seulement apporté à la question leur expérience personnelle à la clinique des maladies infectieuses de la Faculté de Médecine de Paris, où sous l'égide du professeur Mollaret ils ont eu la possibilité de pratiquer une large expérimentation, mais encore une remarquable et très complète compilation des travaux sur la streptomycine publiés à ce jour.

La bibliographie seule des travaux cités occupe 30 pages du livre, qui comprend 42 chapitres. Ils envisagent successivement, dans la première partie comprenant 11 chapitres, la question générale de la streptomycine, c'est-à-dire la fabrication de l'antibiotique, son dosage, son étude *in vitro*, sa toxicité chez l'homme et chez l'animal, ses modes d'emploi, la streptomycino-résistance, etc.

La deuxième partie du livre, la plus importante, expose les applications de la streptomycine aux différentes maladies infectieuses. Les indications principales sont réalisées par la thérapeutique des infections liées aux bactéries hémophiles ou à certaines bactéries Gram-négatives d'origine intestinale, et bien entendu, la tuberculose. En dehors de ces applications majeures, toutes les applications de la streptomycine sont successivement passées en revue au cours des 31 chapitres qui posent nettement les indications et la posologie, et

(1) M. MORIN, J. NEHLIL et R. PICHON, *La streptomycine*, préface du professeur Mollaret, Masson et C^{ie}, éditeur, 1949, 504 pages, 1.950 francs

qui indiquent en même temps les infections où la streptomycine s'est montrée inefficace.

Clair, précis, complet et copieusement documenté, cet ouvrage fait le plus grand honneur à ses auteurs ; d'emblée leur livre s'impose par sa valeur d'enseignement, de documentation et de références, et l'on ne peut que souscrire à l'opinion du professeur Mollaret qui y voit en même temps que l'occasion d'une légitime fierté, la démonstration du succès de ce travail en équipe, dont la recherche médicale a tant besoin en France.

LIVRES RECUS

Ronald A. Fisher. — *The Theory of Inbreeding*. Oliver and Boyd, 98 Great Russel Street, London W. C., 1949, 120 pages. Prix : sh. 10/6.

Tout biologiste est familiarisé avec l'ouvrage fondamental que l'auteur a consacré aux méthodes statistiques à l'usage de la recherche. Le même principe d'investigation statistique et d'analyse mathématique a présidé à la rédaction de ce livre traitant de l'obtention de souches pures par croisements consanguins, question qui a pris une importance capitale aussi bien pour la biologie générale ou l'étude de la sensibilité de l'animal aux infections, que pour les recherches génétiques.

Le problème est étudié dans son ensemble théorique, sous une forme purement mathématique, en fonction des différentes modalités de croisements et de leur incidence génétique du point de vue de la production de souches pures. Même pour le lecteur qui ne suivra pas l'auteur dans son raisonnement mathématique, l'ouvrage est riche en enseignements et permettra utilement d'examiner les conditions sous lesquelles les croisements entre hétérozygotes peuvent aboutir finalement à des lignées pures.

P. LÉPINE.

W. W. W. McEwen. — *Bacteriological Technique*, J. and A. Churchill Ltd. 104 Gloucester Place, London W. 1, 1949, 286 pages, 4 planches.

Manuel élémentaire, clairement présenté et relativement complet des techniques de laboratoire à l'usage des travailleurs et des techniciens. Certaines des techniques indiquées, techniques histologiques en particulier, sont sommairement décrites et ne peuvent guère servir que d'aide mémoire. On trouve, par ailleurs, nombre de renseignements pratiques utiles dans ce petit livre, honoré d'une préface de Sir Alexander Fleming.

P. LÉPINE.

COMMUNICATIONS

**SUR LE PHÉNOMÈNE D'INTERFÉRENCE
ENTRE LA MALADIE DE TESCHEN
ET LE VIRUS POLIOMYÉLITIQUE (SOUCHE LANSING)**

par P. LÉPINE et P. ATANASIU.

Le virus de la maladie de Teschen, que ses caractères physiques rapprochent étroitement du virus poliomyélitique, détermine chez le cochon des lésions du névraxe semblables à celles de la poliomyélite humaine ou expérimentale. Ce fait nous a incités à rechercher s'il existait un phénomène d'interférence entre les deux virus, dans les conditions où nous avons déjà cherché à produire l'interférence avec du matériel suspect de poliomyélite, et différentes souches de virus poliomyélitique [Lépine (1), Lépine, Steigman et Sabin (2)].

Un cochon (cochon n° 2), inoculé par voie intracérébrale avec le virus de Teschen, fait une maladie paralytique typique le septième jour, avec des lésions anatomo-pathologiques caractéristiques de la maladie de Teschen. La moelle lombaire et le cerveau de cet animal nous ont servi à inoculer un autre cochon (cochon n° 4), un singe (n° 716), et 50 souris. Le cochon n° 4 tombe malade le septième jour, tandis que le singe reste indemne pendant soixante jours d'observation.

Les souris reçoivent à des intervalles différents dans le cerveau la souche poliomyélitique Lansing à la dilution 10^{-2} . Le premier lot reçoit par inoculation intracérébrale la souche Lansing huit heures après l'inoculation de la maladie de Teschen, le deuxième groupe vingt-quatre heures après, le troisième trente heures, le quatrième soixante heures et le cinquième soixante-douze heures (voir tableau I).

TABLEAU I.

SOURIS TRAITÉES Intervalle entre les deux inoculations	NOMBRE DE SOURIS SURVIVANTES (sur 10 souris inoculées)	
	le 10 ^e jour	le 20 ^e jour
8 heures.	0	—
24 heures.	0	—
30 heures.	3	0
48 heures.	3	0
72 heures.	4	0
Témoins	2	0

(1) P. LÉPINE, *Science*, 1948, **408**, 131.

(2) P. LÉPINE, A. J. STEIGMAN et A. B. SABIN, *Science*, 1949, **409**, 17.

Cette expérience a été répétée deux fois avec des résultats identiques.

Conclusion. — Il n'existe pas d'interférence entre le virus de Teschen et le virus poliomyélitique (souche Lansing), et le virus de Teschen ne protège pas la souris contre l'inoculation du virus poliomyélitique (souche Lansing).

(Institut Pasteur. Service des Virus.)

ACTION DU BORATE DE PHÉNYL MERCURE SUR LES VIRUS DE LA VARIOLE AVIAIRE, DE LA VACCINE, DE LA RAGE ET DE LA MALADIE DE NEWCASTLE

par P. ATANASIU.

Etant donné que le comportement des virus à l'égard de certains antiseptiques diffère de celui des bactéries, on a cherché des antiseptiques qui ne soient nocifs ni pour le virus, ni pour les tissus et qui soient doués d'une action nette sur tous les germes banaux.

Tel est le borate de phényl mercure qui, n'ayant aucune action sur les virus du groupe encéphalitique, a été employé avec succès pour la conservation du sérum vaccin standard destiné au diagnostic de ces maladies (1).

Ce corps est bien toléré en culture de tissus, qu'il s'agisse de fibroblastes, de cellules épithéliales ou de macrophages (2, 3).

Nous avons essayé cet antiseptique sur 4 virus différents, en utilisant toujours l'animal sensible pour chacun des virus et en titrant au préalable la toxicité de l'antiseptique. Les résultats obtenus se montrent assez intéressants pour que nous ayons cru utile de les publier.

EXPÉRIENCE I. — En étudiant la toxicité de ce produit sur la membrane chorio-allantoïde des œufs de poule en incubation depuis onze jours, nous avons conclu qu'une dose de 0,15 cm³ n'est pas toxique.

Nous avons essayé l'action antiseptique de cette dilution sur le virus vaccinal et le virus variolique (variole aviaire).

Le virus vaccinal est sensible à l'action du phényl mercure (4).

Des dilutions différentes d'antiseptique (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) et des dilutions constantes de virus (10^{-5}) sont mélangées en parties égales et mises à 37° pendant un quart d'heure. On inocule alors des œufs de onze jours en déposant le virus sur la membrane chorio-allantoïde (10 œufs pour chaque dilution et 10 témoins virus).

Pour la variole aviaire, le résultat est lu après sept jours. La

(1) HAMMON et REEVES, *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1945, **60**, 84.

(2) J. WIRTH, *Schweiz. Zeitschr. Path. Bakt.*, 1945, **8**, 129.

(3) PANG et ZIA, *Chin. Med. J. Suppl.*, 1940, **111**, 446.

(4) J. WIRTH et P. ATANASIU, *Ces Annales*, 1948, **74**, 99.

dilution 10^{-4} tue le virus dans 100 p. 100 des cas. La dilution 10^{-5} donne un résultat douteux sur 5 expériences et, à 10^{-6} , l'action efficace de l'antiseptique varie entre 20 et 50 p. 100 (voir le tableau I et la fig. 1, I).

DILUTION de borate de phényl mercure	DILUTION de virus	EXPÉRIENCE I	EXPÉRIENCE II	EXPÉRIENCE III	EXPÉRIENCE IV	EXPÉRIENCE V	TÉMOINS
TABLEAU I — VARIOLE AVIAIRE.							
10^{-4}	10^{-5}	$10^*/0^{**}$	10/0	10/0	10/0	10/0	10/10
10^{-5}	10^{-5}	10/0	10/6	10/0	10/0	10/0	10/10
10^{-6}	10^{-5}	10/8	10/5				10/10
TABLEAU II. — VACCINE (DERMO).							
10^{-4}	10^{-5}	$10^*/0^{**}$	10/0	10/0	10/0		10/10
10^{-5}	10^{-5}	10/2	10/0	10/3	10/0		10/10
10^{-6}	10^{-5}	10/5					10/10
TABLEAU III. — RAGE FIXE (SOUCHE SOURIS).							
10^{-4}	10^{-4}	$10^*/10^{**}$			10/10		10/10
10^{-5}	10^{-5}	10/10			10/10		10/10
TABLEAU IV. — MALADIE DE NEWCASTLE (SOUCHE VAR).							
10^{-4}	10^{-4}	$10^*/10^{**}$			10/10		10/10
10^{-5}	10^{-5}	10/10			10/10		10/10

* Nombre d'œufs ou animaux inoculés.
 ** Nombre d'œufs ou animaux qui ont fait la maladie ou qui ont été tués.
 Les tableaux I et II montrent l'action du phényl mercure sur la variole aviaire et la vaccine; pourcentage des résultats positifs obtenus avec les dilutions 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .
 Les tableaux III et IV montrent l'action négative sur le virus de la rage fixe (souris) et la maladie de Newcastle.

Pour la vaccine, les résultats sont lus trois jours après l'inoculation sur la membrane chorio-allantoïde. La dilution 10^{-4} d'antiseptique donne 10 p. 100 de résultats positifs, tandis que la dilution 10^{-5} n'en donne que 70 et 80 p. 100 et la dilution 10^{-6} 50 p. 100 (voir le tableau II et la fig. 1, II).

EXPÉRIENCE II. — a) Une souche de rage fixe, souche Pasteur adaptée à la souris, dont le taux de virulence dépasse maintenant 10^{-7} , est mise en contact avec le phényl mercure aux dilutions 10^{-4} et 10^{-5} (qui ne sont pas toxiques pour le cerveau de souris), puis est inoculée dans le cerveau des souris. Les résultats sont négatifs, toutes les souris sont mortes de rage (tableau III).

b) Des essais ont également été faits avec le virus de la maladie

de Newcastle, souche « Var » (5). On a employé la même technique pour les dilutions et le matériel a été inoculé dans le liquide chorio-allantoïque. Tous les embryons sont morts entre trois et quatre jours,

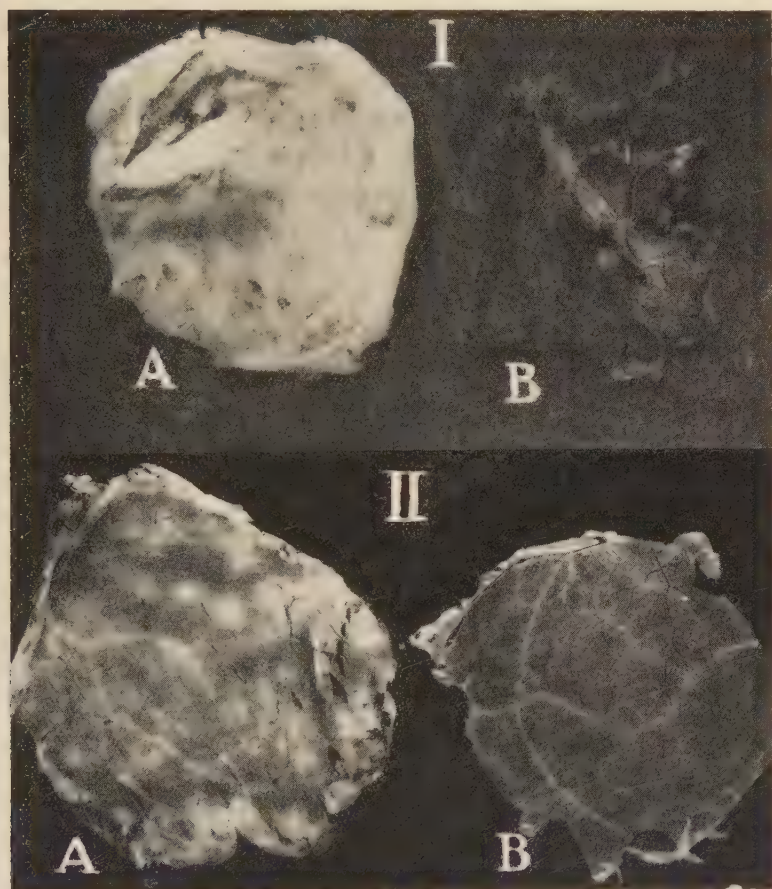


FIG. 4. — I. Membranes chorio-allantoïdes inoculées le onzième jour avec une suspension de variole aviaire et de borate de phényl mercure et prélevées le septième jour après l'inoculation. A, témoin; B, membrane traitée.

II. Membranes chorio-allantoïdes inoculées avec une suspension de vaccine et de borate de phényl mercure et prélevées le troisième jour après l'inoculation. A, témoin; B, membrane traitée.

présentant l'aspect macroscopique de la maladie et l'hémagglutination positive (tableau IV). L'antiseptique ne s'est donc montré doué d'aucune

(5) P. LÉPINE, H. JACOTOT, P. ATANASIU et A. VALLÉE, *Ces Annales*, 1949, 77, 84.

action sur le virus. Cela nous sera utile pour la conservation du sérum standard destiné au diagnostic de la maladie de Newcastle et de la peste aviaire.

DISCUSSION. — L'action de cet antiseptique nous suggère une première conclusion : nous nous trouvons en présence de deux groupes de virus qui répondent différemment à l'action du phényl mercure :

a) Le groupe variole-vaccine se comporte comme les bactéries, l'action de l'antiseptique nous semble identique. Si nous prenons comme exemple du groupe bacilles Gram-négatifs l'*E. coli*, l'action du phényl mercure est totale à 10^{-4} pour une culture de vingt-quatre heures diluée à 10^{-5} . Pour le staphylocoque, la dilution d'antiseptique peut être plus faible, 10^{-5} ou 10^{-6} . La structure des virus de la vaccine et de la variole aviaire se rapproche de celle des bactéries [Mac Farlane (6), Lépine, Atanasiu et Croissant (7)]. Le fait que les virus de la variole et de la vaccine soient tous deux sensibles à l'action du même antiseptique nous a paru un argument intéressant en faveur d'une ressemblance entre ces deux virus et les bactéries.

b) Sur le virus de la rage et de la maladie de Newcastle, groupe de virus dont le diamètre particulière est inférieur aux précédents, et de structure vraisemblablement différente, l'action de l'antiseptique a été totalement négative.

EN CONCLUSION. — Le phényl borate de mercure n'a aucune action sur le virus de la rage et sur celui de la maladie de Newcastle aux dilutions qui tuent les bactéries les plus résistantes (10^{-4} *E. coli*).

Il a une action nocive sur le groupe variole-vaccine, ainsi que sur les bactéries, ce qui nous paraît un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse de caractères communs dans la structure des bactéries et de ces deux virus (Mac Farlane ; Lépine).

(Institut Pasteur. Service des Virus. Dr P. LÉPINE.)

LE CHOC DIT PHÉNIQUÉ EST UN CHOC LAPINIQUE

par P. REMLINGER et J. BAILLY.

Le récent article de MM. H. Marneffe et H. Seys (1) sur la prévention du choc phéniqué au cours du traitement antirabique nous force à revenir en quelques mots sur une question que nous croyions résolue. Nous craignons, en effet, que la description de la forme « solennelle » des accidents et de la mort qu'ils sont susceptibles d'entraîner ne fasse du tort à une méthode de traitement que nous tenons, à tous égards, pour excellente, sinon pour la meilleure. Sans

(6) MAC FARLANE, *Nature*, 1948, **161**, 464.

(7) P. LÉPINE, P. ATANASIU et O. CROISSANT, *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 1068-1070.

(1) H. MARNEFFE et H. SEYS, ces *Annales*, 1949, **77**, 744.

doute la dispersion des injections permet d'éviter ces accidents, mais, à Tanger tout au moins, nous ne nous voyons guère la pratiquant chez la femme, chez l'enfant, jusque dans la fosse lombaire ou à la pointe de l'omoplate. La prévention est beaucoup plus simple. Ainsi que le fait a été bien établi par les Instituts Pasteur de Changhaï et de Tanger, opérant — est-il besoin de le dire ? — tout à fait indépendamment l'un de l'autre, il suffit de remplacer la substance cérébrale du lapin par celle du mouton ou du chien. En particulier, pour ce qui est de l'emploi du chien, la sécurité scientifique s'associe pleinement à l'économie pécuniaire. A Tanger, l'émulsion à 5 p. 100 de substance cérébrale rabique dans de l'eau physiologique phéniquée à 1 p. 100 atténuée par un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve à 37° est injectée journellement au même endroit de la fosse iliaque, alternativement à droite et à gauche, à des doses variant de 5 à 10 cm³. Aucune précaution n'est prise. L'injection est même poussée brusquement. L'injection brusque, telle que nous l'avons vue pratiquer à l'Institut Pasteur de Paris, paraît moins pénible que l'injection lente. Pas plus chez de jeunes enfants que chez des vieillards, pas plus chez des femmes pusillanimes que chez des hommes du peuple indifférents, il n'a été observé d'incident, de malaise, si atténué fût-il. Opérant sur un petit nombre de lapins soumis à des injections quotidiennes de vaccin antirabique phéniqué, MM. Marneffe et Seys ont observé deux fois la mort subite de l'animal. Si, opérant sur un nombre de lapins peut-être un peu plus considérable, ils avaient injecté sous la peau la même substance nerveuse homologue normale ou rabique non phéniquée, ils auraient certainement observé la même mort subite, décrite par l'un de nous (2). Nous ne craignons pas de le répéter : le choc dit phéniqué est un choc lapinique. La substitution au lapin du chien ou du mouton permet de l'éviter à coup sûr.

(Institut Pasteur du Maroc, Tanger.)

MODIFICATION

APPORTÉES PAR OMBRAGE MÉTALLIQUE

A L'ASPECT DES COUPES HISTOLOGIQUES

OBSERVÉES

A L'AIDE DE LA MICROSCOPIE EN LUMIÈRE BLANCHE OU DE LA MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE

par J.-C. LEVADITI, P. LÉPINE, J. GIUNTINI et M^{lle} O. CROISSANT.

La méthode d'ombrage métallique créée par Wyckoff [1] pour la microscopie électronique a été appliquée à la microscopie en lumière blanche par Dempster et Williams [2], qui ont obtenu leurs premiers

(2) P. REMLINGER, ces *Annales*, 1920, **34**, 650.

résultats aussi bien à l'aide de frottis que de coupes histologiques de tissu musculaire et de tissu osseux. Scott et Wyckoff [3] l'ont utilisée également en examinant des répliques ombrées de surfaces dentaires suivant les procédés empruntés à la métallographie.

En France, Bessis [4] a photographié des frottis de sang et étudié les détails du relief cellulaire. De notre côté, avec J. Augier [5], utilisant la microscopie en fluorescence, nous avons appliqué la métallisation à l'examen de coupes histologiques d'organes infectés par différents virus.

Dans le but de connaître les modifications qu'apporte la méthode d'ombrage telle que nous l'avons pratiquée (métallisation sous vide), nous avons dissocié les phases qui composent cette technique, de façon à préciser leurs rôles respectifs.

Technique expérimentale. — Les organes étudiés ont été soit du cerveau de lapin ou de souris, normaux ou infectés par le virus rabique, soit des ganglions de Gasser des mêmes animaux.

Les organes sont fixés avec le mélange de Bouin, Dubosq, Brazil ou avec le fixateur rapide de Lépine et Sautter [6]. Les fragments d'organes sont inclus dans la paraffine selon la technique classique de Mayer pour faire adhérer la coupe à la lame de verre.

Les coupes sont colorées, soit par la méthode de Mann, pour la microscopie en lumière blanche, soit par un fluorochrome, la thioflavine S pour la microscopie en fluorescence [5].

Les préparations ont été :

Soit montées directement après la coloration, selon la technique habituelle, soit après avoir enlevé l'excès de colorant à l'aide d'alcool, on a laissé l'alcool s'évaporer et la préparation est restée pendant cinq minutes à l'air libre ;

Soit soumises en plus à un vide de 10^{-4} mm. de mercure pendant dix minutes ;

Soit métallisées à l'or selon la technique de Williams et Wyckoff [4], en plaçant la lame encore humide d'alcool dans la cloche à métalliser et en l'inondant à nouveau d'alcool dès sa sortie de la cloche. Toutes ces préparations ont été finalement immergées à nouveau dans l'alcool, puis dans le xylol, et enfin montées au baume du Canada entre lame et lamelle avant d'être examinées.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX. — 1° *Lames colorées laissées cinq minutes à l'air libre par évaporation de l'alcool* (1). L'aspect d'ensemble de la coupe est inchangé par rapport aux préparations histologiques habituelles, mais la coupe a perdu sa transparence. Les détails cytologiques sont modifiés et demandent une interprétation. Les fibrilles de la substance blanche sont moins fortement teintées et leur diamètre est augmenté. Les bords des cellules et surtout des noyaux sont sinueux et irréguliers. Le protoplasme cellulaire est condensé en grumeaux. Les noyaux sont d'un plus grand diamètre. Le réseau de basi-chromatine a perdu son aspect de fin réticulum pour n'être plus formé que de grains irréguliers et conglomérés en masses également irrégulières.

(1) Nous avons également laissé les lames vingt-quatre heures et même quatre jours à l'air libre sans modification apparente supplémentaire.

Les nucléoles ne sont pas modifiés, mais, comme les corps de Negri, leurs bords sont plus flous et leur teinte plus pâle.

Les corps de Negri sont toujours visibles ; ceux qui sont homogènes le sont restés, mais ceux qui ont une structure interne [7] l'ont en partie perdue ; leur configuration intérieure est devenue irrégulière et ils sont difficilement interprétables.

2° *Lames laissées cinq minutes à l'air libre par évaporation de l'alcool, puis soumises cinq minutes au vide à 10^{-4} mm. de Hg avant d'être montées au baume.* — Leur aspect général est pratiquement identique à celui des préparations précédentes. Même aspect spongieux de la substance cérébrale. La basi-chromatine des noyaux est toujours granuleuse et n'a plus sa structure habituelle de fin réseau.

C'est donc surtout le fait de laisser l'alcool s'évaporer qui provoque l'altération, car le vide ne la modifie pratiquement pas.

3° *Lames métallisées sous incidence oblique.* — L'aspect de ces préparations est très différent de ce qu'on est accoutumé de voir avec les préparations habituelles. Le relief de la surface de section n'est pas lisse, mais granuleux et sans rapport avec les striations laissées par les irrégularités du rasoir. La substance grise est plus homogène, moins en relief que la substance blanche dont les fibres nerveuses ombrées sont enchevêtrées.

Les modifications des cellules, du protoplasme, des noyaux sont les mêmes que dans les lames précédentes, mais les détails sont plus apparents. La surface de la cellule a l'aspect d'un plateau granuleux, les bords du noyau sont surélevés, et celui-ci creuse la surface de la cellule à la façon d'un cratère. Dans le fond des noyaux et à leur périphérie, la chromatine est irrégulièrement disposée, irrégularité de forme et de situation plus apparente du fait de la métallisation. Au centre, les nucléoles sont légèrement surélevés par rapport au fond des noyaux (2).

Le protoplasma de quelques cellules ganglionnaires altérées par le virus rabique possède des contours déchiquetés, irréguliers. Leur surface est vallonnée, des vacuoles y sont visibles.

La surface des corps de Negri est aussi irrégulière que celle du protoplasme des cellules, mais elle est surélevée par rapport au reste de la cellule. Pour les inclusions contenant des granulations, les irrégularités de surface ne dépendent pas de la structure interne lorsqu'elle reste encore visible.

On n'est pas certain que les surélévations observées, celles du corps de Negri, par exemple, soient effectivement présentes dans les coupes habituelles non desséchées. Cette surélévation peut être due à une rétraction moins considérable sous l'influence de l'évaporation de l'alcool.

DISCUSSION. — Au cours de la métallisation, les coupes ont été laissées un certain temps sans être immergées dans l'alcool. Elles ne sont plus imbibées d'alcool et, à la température ordinaire, des déformations

(2) Ce changement d'aspect suggère que le suc nucléaire incolore ou nucléoplasma, situé dans le noyau et dans lequel baignent les fragments de basichromatine, a été rétracté en cupule.

supplémentaires se sont produites au moment où l'alcool s'est évaporé.

Les préparations histologiques collées à la lame de verre ont ainsi été soumises à un traitement formellement déconseillé par les histologistes, la coupe devant rester constamment immergée dans un liquide : eau, alcool, etc., avant d'être montée au baume. On sait [8] que la fixation des coupes histologiques modifie plus ou moins profondément la structure cellulaire et fait apparaître une véritable différenciation optique en coagulant et en précipitant les protéines, soit par oxydation, soit par déshydrogénation. Mais ce n'est pas par simple dessiccation que se fait la fixation.

Il en est différemment des frottis de sang ou de germes qui sont fixés par dessiccation rapide. Dans la pratique, les frottis métallisés, examinés au microscope optique ou en fluorescence, quoique modifiés par la métallisation, le sont de façon beaucoup moins apparente que les coupes histologiques.

En plus de cette différence de fixation, le fait que les éléments constituant ces frottis n'ont pas été sectionnés, que leurs membranes limitantes sont intactes, et que, par conséquent, les rapports de structure interne restent respectés, explique cette moindre modification des frottis par rapport aux coupes.

CONCLUSIONS. — L'ombrage métallique de la surface des coupes histologiques étudiées (cellules de l'encéphale ou de ganglion de Gasser d'animaux normaux ou rabiques) confirme la mise en relief des préparations examinées à l'aide de la microscopie en lumière blanche ou de la microscopie en fluorescence.

Le fait de laisser s'évaporer l'alcool dans lequel étaient immergées les préparations en cours de métallisation modifie l'aspect des coupes histologiques.

La préparation perd sa transparence et acquiert une finesse moins grande. Les altérations du noyau, du protoplasma et des inclusions aboutissent à un changement de configuration que souligne la métallisation proprement dite.

Ces notions ne doivent pas être perdues de vue dans l'interprétation des images des structures histologiques obtenues en microscopie électronique.

(Institut Pasteur. Service des Virus. Dr P. LÉPINE.)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WILLIAMS (R. C.) et WYCKOFF (R. W. G.). *J. applied Physics*, 1944, **15**, 712.
- [2] DEMPSTER (W. T.) et WILLIAMS (R. C.). *The Anatomical Record*, 1946, **96**, 27.
- [3] SCOTT (D. B.) et WYCKOFF (R. W. G.). *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1949, **49**, 63.
- [4] BESSIS (M.). *Revue Hématol.*, 1949, **4**, 95 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1496.
- [5] LEVADITI (J.-C.), LÉPINE (P.) et AUGIER (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **227**, 1061.
- [6] LÉPINE (P.) et SAUTTER (M^{lle} V.). *Bull. Histol. appliquée*, 1936, n° 6, 289.

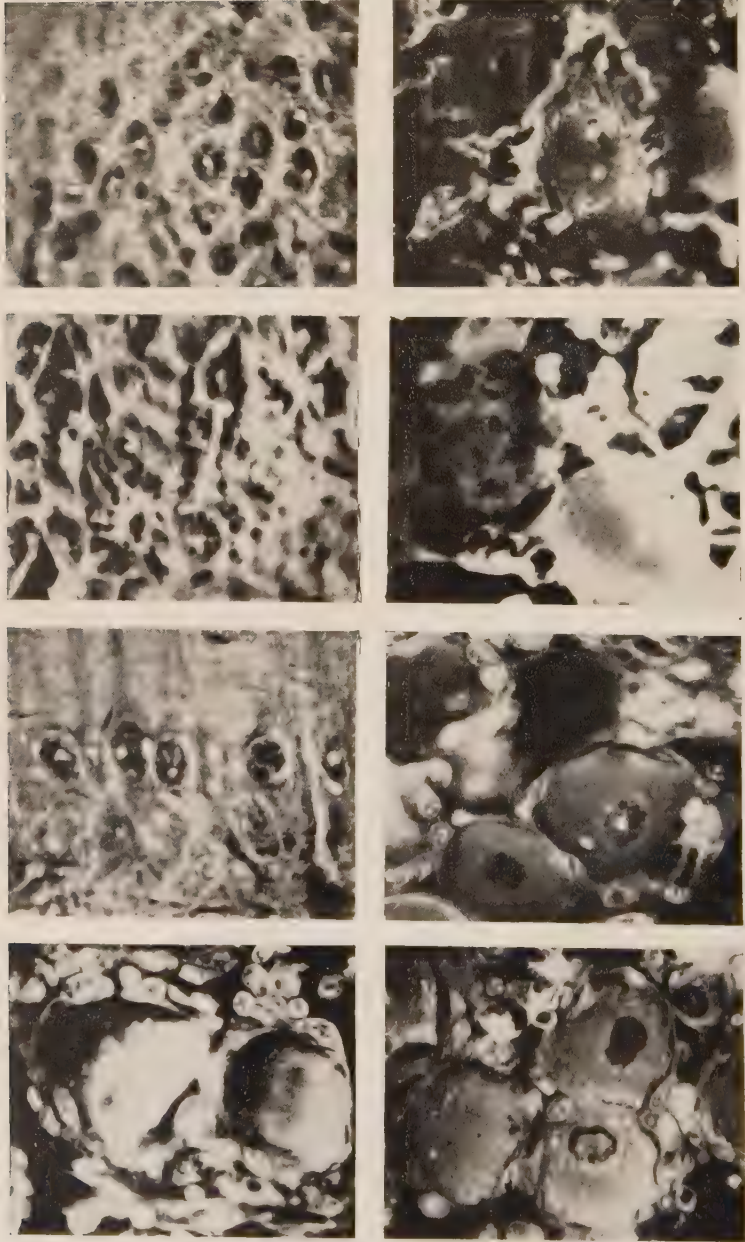
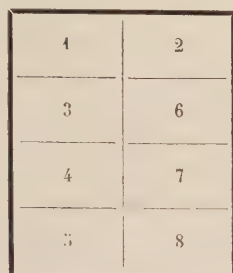


PLANCHE I.

- [7] LEVADITI (C.), NICOLAU (S.) et SCHOEN (M^{lle} R.). *Ces Annales*, 1926, **50**, 973.
 — LEVADITI (C.), SCHOEN (R.) et MEZGER (J. G.). *Bull. Acad. Méd.*, 1932, **107**, n° 22.
 [8] LANGERON (M). *Précis de Microscopie*, Masson, éditeur, Paris, 1949.

Photomicrographies en fluorescence de coupes histologiques, métallisées ou non, imprégnées par la thioflavine. (Gross. : 800.)

PLANCHE I



- FIG. 1. — *Ganglion de Gasser de lapin rabique*. Présence de corps de Negri de tailles inégales, irrégulièrement repartis à la périphérie du protoplasme d'une cellule ganglionnaire.
- FIG. 2. — *Ganglion de Gasser de lapin rabique*. Cellules en voie d'altération de type pycnotique avec dégénérescence du protoplasma. Absence de corps de Negri.
- FIG. 3. — *Ganglion de Gasser de lapin rabique*. Présence de corps de Negri ovalaires, homogènes à limite nette.
- FIG. 4. — *Ganglion de Gasser de lapin rabique*. Lamé laissée à l'air libre par évaporation de l'alcool. Apparition d'artefacts protoplasmiques. Perte de la structure homogène habituelle du protoplasme.
- FIG. 5. — *Ganglion de Gasser de lapin rabique*. Lamé métallisée. Aspect granuleux de la surface protoplasmique et impression de relief des corps de Negri.
- FIG. 6. — *Corne d'Ammon d'encéphale de lapin rabique*, contenant de nombreux corps de Negri intraprotoplasmiques, juxta-nucléaires.
- FIG. 7. — *Corne d'Ammon d'encéphale de lapin rabique*. Lamé laissée à l'air libre par évaporation de l'alcool. Présence d'artefacts protoplasmiques et nucléaires nettement visibles par comparaison avec la figure précédente.
- FIG. 8. — *Corne d'Ammon d'encéphale de lapin rabique*. Lamé métallisée. Les inclusions de la rage apparaissent en relief. Les artefacts cytologiques sont toujours visibles.

RÉACTIONS D'HÉMAGGLUTINATION PRATIQUÉES COMPARATIVEMENT AVEC L'ANTIGÈNE TYPE MIDDLEBROOK ET DUBOS ET AVEC LA TUBERCULINE PRÉCIPITÉE

par CH. GERNEZ-RIEUX et A. TACQUET.

Nous avons signalé précédemment (1) l'intérêt, pour le diagnostic de la tuberculose, de l'hémagglutination des globules de mouton sensibilisés par des extraits de bacilles tuberculeux humains.

Middlebrook et Dubos (2) avaient constaté qu'il est possible d'extraire de la vieille tuberculine un antigène utilisable pour cette réaction. Récemment, MM. Sohier, Juillard et Trimberger (3) ont présenté les résultats qu'ils ont obtenus en sensibilisant des globules de mouton par la tuberculine précipitée.

Il nous a paru intéressant de comparer les différentes méthodes de sensibilisation proposées, en utilisant, soit des extraits de bacilles tuberculeux humains ou bovins, soit la tuberculine précipitée au 1/100 de l'Institut Pasteur.

Dans une première série de recherches, nous avons utilisé comparativement la technique originale de Middlebrook et Dubos et la technique décrite par Sohier.

Les hémagglutinations ont été réalisées après sensibilisation de 0,1 cm³ de globules rouges lavés et concentrés par 2 cm³ d'antigène extrait de bacilles tuberculeux. La sensibilisation des globules rouges par la *tuberculine précipitée* au 1/100 a été pratiquée suivant la technique de Sohier ; 2,5 cm³ de tuberculine sensibilisent 0,15 cm³ de globules rouges.

Dans les deux cas, la lecture a été faite après deux heures d'incubation à 37° et après vingt-quatre heures d'incubation à 12°, conformément à ces auteurs. Nous ne considérons comme positifs que les sérums donnant une agglutination pour des dilutions supérieures à 1/8.

Voici les résultats de l'étude de 92 sérums animaux et humains.

1° **SÉRUMS D'ANIMAUX OU DE SUJETS NON TUBERCULEUX.** — Les sérums de 4 lapins et d'un chien neufs ont tous donné une réaction constamment négative (taux inférieur au 1/8), avec les deux méthodes. Par contre, le sérum d'un lapin ayant reçu une injection sous-cutanée de 1 cm³ de tuberculine précipitée au 1/100 donnait une réaction faiblement positive avec l'antigène extrait de bacilles tuberculeux humains (taux + 1/16), tandis que la réaction était nettement positive avec les globules sensibilisés à la tuberculine (taux 1/64).

(1) Ch. GERNEZ-RIEUX et A. TACQUET, *Bull. Acad. Med.*, 1949, n° 27-28, 556.

(2) G. MIDDLEBROOK et R. DUBOS, *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 521.

(3) R. SOHIER, J. JUILLARD et I. TRIMBERGER, ces *Annales*, 1950, **78**, 283.

Ving et un sérums de sujets cliniquement indemnes de tuberculose nous ont donné les résultats suivants :

20 réactions négatives et 1 réaction positive avec l'antigène et la technique de Middlebrook et Dubos ;

17 réactions négatives et 4 réactions positives avec la tuberculine et la technique de Sohler.

Le sérum qui s'était montré positif avec le premier antigène était négatif avec la tuberculine. Les quatre réactions positives avec la tuberculine (dont deux à un taux très élevé) étaient négatives avec le premier antigène.

En résumé, l'étude de 26 sérums provenant d'animaux sains ou de sujets cliniquement indemnes de tuberculose montre 96 p. 100 d'hémagglutinations négatives, après vingt-quatre heures, en utilisant des antigènes extraits de bacilles tuberculeux humains (H_{37} Rv ou H_{37} Ra).

Avec la tuberculine précipitée, la lecture après incubation pendant deux heures à 37° donne un pourcentage plus faible de réactions négatives : 84 p. 100.

Nous avons renoncé à la lecture des hémagglutinations à la tuberculine, après vingt-quatre heures, la plupart des tubes présentant, à ce moment, une agglutination que nous avons considérée comme non spécifique.

TABLEAU I.

	ANTIGÈNE TUBERCULEUX (I)	TUBERCULINE (II)
Réactions négatives. . . .	25	22
Réactions positives. . . .	1	4

2° SÉRUMS D'ANIMAUX AYANT REÇU DU BCG OU ATTEINTS DE TUBERCULOSE ET SÉRUMS DE SUJETS TUBERCULEUX. — a) Sept sérums de lapins ayant reçu du BCG par voie intraveineuse (une injection de 1/2 mg.) ou par scarification (une série de trois scarifications de 1 cm. au niveau du flanc droit) ont présenté tous, au vingt et unième jour, une réaction positive aussi bien avec l'antigène extrait de bacilles tuberculeux, soit humains (5 + sur 5), soit bovins (2 + sur 2) qu'avec les globules rouges sensibilisés à la tuberculine. Toutefois, l'hémagglutination a été, dans 4 cas, nettement plus marquée par cette dernière méthode.

TABLEAU II.

	ANTIGÈNE TUBERCULEUX (I)	TUBERCULINE (II)
Réactions négatives. . .	0	0
Réactions positives. . .	7	7 { 3 à un taux égal à (I). 4 à un taux plus élevé.

b) Dix-sept sérums de vaches atteintes de tuberculose confirmée par l'autopsie ont donné :

15 résultats positifs avec l'antigène extrait de bacilles tuberculeux ;
13 résultats positifs avec les globules sensibilisés à la tuberculine.

L'hémagglutination a été, dans 5 cas, nettement plus marquée par cette dernière méthode.

TABLEAU III.

	ANTIGÈNE TUBERCULEUX (I)	TUBERCULINE (II)
Réactions négatives . .	2	4 [2 étaient négatifs en (I)].
Réactions positives . . .	15	13 { 8 à un taux égal à (I). 5 à un taux plus élevé.

c) Quarante-deux sérums de sujets humains atteints de tuberculose ulcéro-caséenne ont été étudiés en présence d'hématies sensibilisées par des antigènes extraits de bacilles tuberculeux humains ou bovins, ou par la tuberculine.

34 d'entre eux ont été positifs après vingt-quatre heures dans la première série. On remarquera que la proportion des réactions positives avec l'antigène humain est nettement plus grande que celle des réactions positives avec l'antigène bovin.

35 de ces sérums ont été positifs après deux heures dans la seconde.

Par ailleurs, l'hémagglutination a été, dans 12 cas, nettement plus marquée avec la tuberculine qu'avec les extraits antigéniques.

TABLEAU IV.

	ANTIGÈNES TUBERCULEUX (I)			TUBERCULINE (II)
	Antigène humain	Antigène bovin	Total	
	35 sér.	7 sér.	42 sér.	
Réactions négatives.	5	3	8	7 [dont 7 des 8 sérums négatifs en (I)].
Réactions positives.	30	4	34	35 { 23 à taux égal à (I). 12 à taux plus élevé.

En résumé, les deux techniques fournissent, pour ces 66 sérums, un pourcentage très voisin de réactions positives (environ 85 p. 100). Ces résultats d'ensemble sont résumés dans le tableau suivant :

TABLEAU V. — Résultats d'ensemble des 66 sérums.

	ANTIGÈNES TUBERCULEUX (I)	TUBERCULINE (II)
Réactions négatives. . . .	10	11
Réactions positives. . . .	56	55

La tuberculine précipitée au 1/100 de l'I. P. possède donc les éléments nécessaires aux réactions d'hémagglutination. Les sérums de sujets et d'animaux tuberculeux ou d'animaux traités par le BCG donnent, avec les hématies sensibilisées à la tuberculine, une hémagglutination comparable à celle qui est obtenue avec les extraits antigéniques. Les taux d'agglutination sont, en général, plus élevés avec la tuberculine qu'avec les extraits de bacilles tuberculeux. Toutefois, le taux d'hémagglutination obtenu avec la tuberculine en présence de sérums normaux dépasse plus souvent le taux limite de 1/8 qu'avec les extraits antigéniques. Enfin, la lecture, après vingt-quatre heures, des hémagglutinations par la méthode à la tuberculine, selon la technique de Sohier, donne un tel pourcentage de réactions positives que la réaction semble perdre, avec ce délai, toute spécificité.

Nous nous sommes demandé si certaines modifications de cette technique ne seraient pas susceptibles de lui conférer plus de spécificité.

Nous avons tout d'abord substitué à la technique décrite par cet auteur (volume de sérum : 0,3 cm³ ; d'hématies sensibilisées : 0,05 cm³)

TABLEAU VI.

			ANTIGÈNES TUBERCULEUX		TUBERCULINE
			Humain	Bovin	
Sérums non tuberculeux	4 Sérums de lapins.	R. — . .	4		4
		R. + . .	0		0
	2 Sérums humains.	R. — . .	2		2
		R. + . .	0		0
Sérums tuberculeux ou sérums d'animaux traités par le BCG.	3 Sérums de lapins (BCG).	R. — . .	0		0
		R. + . .	3		3
	19 Sérums humains.	R. — . .	4	3	0
		R. + . .	13	2	19

celle de Middlebrook et Dubos, mais en remplaçant l'antigène par la tuberculine précipitée.

Cette méthode nous a donné des résultats très voisins de ceux obtenus avec les antigènes extraits de bacilles tuberculeux.

La lecture des hémagglutinations a été possible après vingt-quatre heures, sans qu'interviennent des réactions non spécifiques ; de plus, les proportions de sérum et de tuberculine utilisées selon cette technique nous ont procuré des agglutinations de lecture plus facile que par la méthode préconisée par Sohier. (Tableau VI.)

L'utilisation de la tuberculine selon la méthode de Middlebrook et Dubos donnant des résultats d'une spécificité suffisante, nous avons recherché la dose limite de tuberculine précipitée au 1/100 permettant la sensibilisation des globules.

Cette étude comparative nous a montré qu'une dose très faible (0,01 cm³ de tuberculine pour 0,1 cm³ de globules) ne pouvait être utilisée pour ces réactions.

Les doses plus fortes (0,04 cm³, 0,05 cm³, 0,1 cm³) sensibilisent nettement les globules à l'hémagglutination en présence des sérums tuberculeux ; mais, dans ces conditions, certains sérums ne donnent d'hémagglutination qu'à des dilutions très peu élevées.

Nous reproduisons ci-dessous les taux obtenus avec quelques-uns de ces sérums :

TABLEAU VII.

	ANTIGÈNE tuberculeux humain	TUBERCULINE					
		1 cm ³	0,5 cm ³	0,1 cm ³	0,05 cm ³	0,04 cm ³	0,01 cm ³
Sérum tuberculeux . .	+ 1/64	+ 1/32	+ 1/32	+ 1/32	+ 1/32	+ 1/32	0
Sérum tuberculeux . .	+ 1/32	+ 1/64	+ 1/32	+ 1/32	+ 1/32	+ 1/128	0
Sérum tuberculeux . .	+ 1/32	+ 1/64	+ 1/64	+ 1/64	+ 1/8	+ 1/8	0

La dose limite utilisable nous semble correspondre à 0,5 cm³ de tuberculine précipitée pour 0,1 cm³ de globules rouges de mouton.

Enfin, dans une autre série d'expériences, nous avons essayé de sensibiliser les globules par la tuberculine I. P. 48. Nous n'avons pu y parvenir, tout au moins en suivant les techniques utilisées ci-dessus.

EN RÉSUMÉ : Les réactions d'hémagglutination peuvent être réalisées avec la tuberculine précipitée au 1/100 de l'Institut Pasteur.

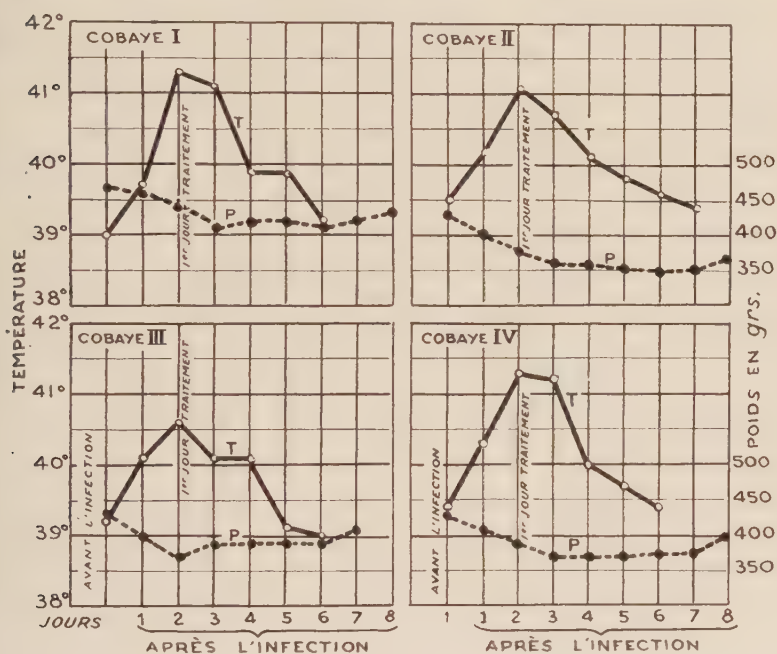
La technique originale décrite par Middlebrook et Dubos peut être utilisée en sensibilisant 0,1 cm³ de globules rouges de mouton lavés et concentrés par 0,5 cm³ de tuberculine. Les résultats sont très voisins de ceux obtenus avec les extraits antigéniques préparés suivant la méthode de ces auteurs. La lecture des réactions est facile : le taux d'hémagglutination, lu après vingt-quatre heures, est analogue dans les deux séries de réactions.

(Institut Pasteur de Lille.)

ACTION DE LA STREPTOMYCINE DANS LA PSEUDO-TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE

par ANDRÉ VALLÉE.

Depuis la découverte par Waksman de la streptomycine, de nombreuses recherches ont révélé l'action de cet antibiotique dans une gamme très variée d'affections microbiennes. *Pasteurella pestis*, entre



autres, est très sensible à l'action de la streptomycine *in vitro* et *in vivo*. Le Dr Girard, de l'Institut Pasteur, fixe à 125 mg. la dose totale nécessaire à assurer la survie de cobayes infectés, par voie trachéale, avec une souche hypervirulente de peste. En raison de la parenté qui existe entre *Pasteurella pestis* et le bacille de Vignal et Malassez, il était logique de penser que la même action (bactériostatique et bactéricide) pourrait s'exercer contre le dernier de ces germes. C'est ce que nous avons voulu vérifier.

Essais « in vitro ». — Après quelques essais préliminaires, nous avons adopté des quantités de streptomycine allant de 20 à 50 γ par tube

contenant 10 cm³ de bouillon, soit 2 à 5 γ au centimètre cube. Chaque tube est ensemencé avec 1/10 de centimètre cube de culture de bacille de Vignal et Malassez âgée de vingt-quatre heures.

En vingt-quatre heures, seul le tube I (2 γ) donne une culture. En quarante-huit heures, tous sont positifs jusqu'au XXI exclu (4 γ). Le quatrième jour, seul le tube ayant reçu 5 γ est et restera négatif.

Donc, dans notre essai, la dose inhibitrice de streptomycine peut être fixée à 5 γ au centimètre cube, soit 5/1.000 de milligramme (1).

Nous avons également, en ajoutant des quantités croissantes d'antibiotique à des cultures de vingt-quatre heures, établi qu'une dose de 100 γ au centimètre cube stérilisait complètement cette culture en vingt-quatre heures.

Essais « in vivo ». — 1° Deux cobayes reçoivent 1 cm³ de culture de vingt-quatre heures de bacille de Vignal et Malassez (isolé du porc) par voie intrapéritonéale, puis, à partir du troisième jour de l'infection, l'un 25 mg. de streptomycine pendant quatre jours, l'autre 25 mg. de streptomycine pendant six jours. Le premier meurt neuf jours, le deuxième onze jours après l'infection. Deux témoins, non traités, succombent en cinq jours.

2° La dose de streptomycine est portée à 250 milligrammes, répartis sur cinq jours. Deux cobayes sont traités. L'un meurt vingt et un jours après l'infection. L'autre survit. Deux témoins, non traités, succombent en quatre jours.

3° Quatre cobayes sont traités avec 300 mg. de streptomycine, à raison de 50 mg. par jour (deux injections de 25 mg. dans 1/2 cm³ d'eau physiologique). Tous résistent, alors que 2 témoins meurent en cinq jours.

Les variations thermiques et pondérales sont relevées dans le tableau ci-dessous et concrétisées dans les courbes qui le précèdent :

JOURS	COBAYES							
	I		II		III		IV	
	T	P	T	P	T	P	T	P
Avant l'inoculation	39	472	39,5	425	39,2	438	39,4	435
1.	39,7	460	40,2	400	40,1	398	40,3	412
2.	41,3	435	41,1	380	40,7	370	41,3	385
3.	41,1	415	40,7	360	40,1	385	41,2	365
4.	39,9	420	40,1	365	40,1	385	40	365
5.	39,9	420	39,8	355	39,1	385	39,7	362
6.	39,1	412	39,4	345	39	385	39,4	365
7.	39	415	39,1	350	39,1	405	39,4	375
8.		435		375		435		400

On peut constater que les poids ont baissé régulièrement après

(1) Ces quantités sont exprimées en unités de base.

l'inoculation infectante jusqu'au quatrième jour. Le cinquième jour, soit après trois jours de traitement, la stabilisation s'amorce.

La température, qui atteint son plafond le troisième jour après l'infection, marque, dès le lendemain de la première injection de streptomycine, une baisse sensible qui s'accroît les jours suivants. A la cinquième injection, la température est redevenue normale.

Après un mois d'observation, les 4 cobayes sont apparemment en excellent état. Les poids initiaux sont dépassés. A ce moment, 2 d'entre eux sont réinfectés, par voie intrapéritonéale, avec 1 cm³ de culture de la même souche de bacille de Vignal et Malassez. Aucun trouble n'en résulte.

Sacrifiés deux mois après le commencement de l'expérience, 3 parmi les 4 sujets ne présentent aucune lésion de pseudo-tuberculose : ni adhérences traduisant une péritonite ancienne, ni abcès viscéraux ou ganglionnaires, comme il est de règle d'en rencontrer dans les formes à évolution plus lente. On note, cependant, une hypertrophie marquée du foie et surtout de la rate. L'examen histologique de cette dernière révèle une hyperplasie réticulaire et la présence de plages hémorragiques. Sur le quatrième cobaye, qui ne faisait pourtant pas partie du lot réinfecté, on note de multiples adhérences : foie, estomac, rate et masse intestinale sont littéralement collés les uns contre les autres. Trois petits abcès siègent sur le poumon. Lesensemencements ne permettent cependant pas d'isoler le bacille responsable de la maladie.

CONCLUSION. — La streptomycine possède un pouvoir bactériostatique et bactéricide, *in vivo* et *in vitro*, contre le bacille de Vignal et Malassez.

In vitro : 5 γ par centimètre cube ont été nécessaires pour inhiber le développement dans un tube de bouillon ensemencé avec 1/10 de centimètre cube de culture de vingt-quatre heures. 100 γ par centimètre cube stérilisent une culture en bouillon de vingt-quatre heures.

In vivo : 300 mg. de streptomycine ont permis la survie de cobayes infectés avec une souche de Vignal et Malassez tuant les témoins en cinq jours, le traitement n'étant commencé qu'au troisième jour de l'infection.

D'autres essais sont indispensables, avec des souches de diverses origines, pour obtenir confirmation de propriétés d'autant plus intéressantes qu'aucun autre agent thérapeutique n'est, à notre connaissance, capable de guérir les malades atteints de pseudo-tuberculose.

(Institut Pasteur. Service de Microbiologie animale.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Existence à Madagascar de l'encéphalomyélite enzootique des porcs (maladie de Teschen), par P. LÉPINE et P. ATANASIU.

La taille des germes composant le vaccin BCG d'après le milieu d'entretien ; son importance pour le dosage du vaccin, par F. VAN DEINSE, R. S. SEYS et F. MACHOLDA.

ÉLECTIONS

Ont été élus membres de la *Société Française de Microbiologie* :

M. le professeur Twort, membre d'honneur.

M^{mes} Marie-Paule Beumer-Jochmans, Lise Quersin-Thiry, Nelly Delmotte-Dekeyser, Andrée Deveen-Vandewyer, Nadine Chome, L. Blum-Emerique et J. Josse-Goichot.

MM. Jacques Beumer, Willy Koopmansch, Santiago Americano Freire, Ewald Edlinger, Léonce Saint-Prix, Edouard Drouhet, Tiberiu Metianu, Nél et Barbier.

Le Gérant : G. MASSON.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.)

EXTRAIT DES STATUTS :

Article premier. — L'association dite Association des Microbiologistes de Langue Française, fondée en 1937, à Paris, a pour but de grouper les Microbiologistes de langue française et de créer entre eux un lien. Elle a son siège à Paris.

L'association se compose de membres nationaux et de membres étrangers de toutes langues.

La langue française est la langue officielle des Congrès de l'Association et celle de la publication de ses travaux.

Art. 2. — L'A. M. L. F. est instituée uniquement pour l'étude et la discussion en commun de toutes les disciplines relevant de la science microbiologique.

Art. 3. — Les membres nationaux de l'A. M. L. F., ainsi que les membres étrangers résidant habituellement en France constituent la Section française de l'A. M. L. F. ou SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE. La Section française de l'A. M. L. F. reçoit dans l'intervalle des Congrès une délégation permanente du Conseil de l'A. M. L. F. Son activité est régie par un règlement intérieur, approuvé par l'Assemblée Générale.

Art. 4. — La Section française de l'A. M. L. F. ou SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE, constitue de plein droit la Section française de l'Association internationale de Microbiologie.

Art. 5. — Peut faire partie de l'Association toute personne remplissant une fonction scientifique dans un laboratoire de microbiologie (microbiologie pure ou appliquée, bactériologie, pathologie infectieuse, immunologie, sérologie, chimiothérapie, cancérologie), ou ayant publié des travaux scientifiques de microbiologie.

Art. 23. — *Publications* — Les publications des travaux exposés dans les séances mensuelles se font dans les conditions et selon les modalités décidées par le Bureau de la Section française.

Le Bureau peut refuser de publier tout travail ou communication, qui ne serait pas conforme aux buts de l'association ou au caractère de ses publications. Ses décisions sont sans recours.

Art. 27. — Les auteurs des communications et démonstrations devront être membres de l'Association. Les étrangers à l'Association ne seront acceptés comme auteurs que s'ils ont pour co-signataire un membre de l'Association, ou s'ils ont été invités par le Bureau à faire une communication, ou si un membre de l'Association ayant assisté aux recherches rapportées se charge de discuter le travail en séance.

En dehors des Congrès, dont la périodicité et la date sont fixées par l'Assemblée Générale sur la proposition du Bureau, l'Association se réunit en séances consacrées à des communications scientifiques, le premier jeudi de chaque mois (août et septembre exceptés), à 16 heures. Les séances ont lieu au Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur ; elles sont publiques.

Les membres désirant présenter des communications sont priés d'en aviser le Secrétaire général, et de lui en communiquer le titre, pour permettre l'établissement de l'ordre du jour de la réunion.

Le texte des communications doit être remis à la séance, établi *ne varietur*, en exemplaire dactylographié original. La bibliographie

des auteurs cités sera établie, conformément aux règles admises par l'Association Internationale de Microbiologie, dans l'ordre suivant : *nom* de l'auteur, *titre* du périodique (en abrégé et en italiques), *année* de publication, *tome* (en chiffres arabes gras), *page*. Les signes t., p., etc., sont supprimés. Les abréviations des noms de périodiques courants figurent sur une liste qui sera adressée aux auteurs, sur leur demande. Les figures illustrant le texte doivent être remises avec leurs clichés typographiques, sinon il pourra en résulter des délais de publication. La Rédaction se charge, le cas échéant, de faire faire tous les dessins, graphiques, tracés, et de faire cliquer, aux frais des auteurs, tous les documents qui lui seront adressés à temps, soit huit jours au moins avant la séance, pour parution dans le numéro suivant des *Annales de l'Institut Pasteur*.

En raison des restrictions apportées aux publications par les circonstances actuelles, le texte de chaque communication ne pourra occuper plus de deux pages de l'emplacement réservé dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, soit environ 1.200 mots. Les références bibliographiques et les clichés, s'il y en a, seront compris dans cet espace. Toute communication dépassant ce maximum sera retournée à son auteur, ou devra avoir été préalablement acceptée par la Rédaction des *Annales de l'Institut Pasteur*, pour y paraître en Mémoire.

Le Secrétaire général : P. LÉPINE.

RECEIVED

MAY 15 1950

Séance du 2 Février 1950.

CHESEBROUGH MFG. CO.
CONSOLIDATED
McKEES ROCKS PLANT

SOMMAIRE

Pages.

Présentation d'ouvrage. 538

Livres reçus. 539

Communications :

Sur le phénomène d'interférence entre la maladie de Teschen et le virus polio-
myélitique (souche Lansing), par P. LÉPINE et P. ATANASIU. 540

Action du borate de phényl mercure sur les virus de la variole aviaire, de la
vaccine, de la rage et de la maladie de Newcastle, par P. ATANASIU 544

Le choc dit phéniqué est un choc lapinique, par P. REMLINGER et J. BAILLY. 544

Modifications apportées par ombrage métallique à l'aspect des coupes histo-
logiques observées à l'aide de la microscopie en lumière blanche ou
de la microscopie en fluorescence, par J.-C. LEVADITI, P. LÉPINE, J. GIUN-
TINI et M^{lle} O. CROISSANT. 545

Réactions d'hémagglutination pratiquées comparativement avec l'antigène type
Middlebrook et Dubos et avec la tuberculine précipitée, par Ch. GERNEZ-
RIEUX et A. TACQUET. 550

Action de la streptomycine dans la pseudo-tuberculose expérimentale du co-
baye, par ANDRÉ VALLÉE. 555

Élections. 558